



UNIVERSITE PARIS SUD

FACULTE DE MEDECINE

Ecole Doctorale de Cancérologie : Biologie, Médecine, Santé

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS SUD
Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

présentée et soutenue le 19 décembre 2012 par

Lue HUANG

Analyse de l'efficacité de la régulation par les microARN

Directeur de thèse : Dr. François DAUTRY

JURY

Dr. Christophe ANTONIEWSKI	Président, Examineur
Dr. Pierre BUSSON	Examineur
Dr. Michel LACASA	Rapporteur
Dr. Hervé SEITZ	Rapporteur
Dr. François DAUTRY	Directeur de thèse

Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée
ENS Cachan, 61 Av du Président Wilson, 94235 Cachan cedex

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier François de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir proposé le sujet de thèse. Merci de ses nombreux conseils, de son encadrement attentif, de son soutien et de sa patience. Merci aussi de ses aides lors des démarches pour la recherche des financements. Je tiens également à le remercier de son aide indispensable durant la rédaction de ce manuscrit. Merci encore de m'avoir accordé des opportunités de participer à de nombreuses conférences scientifiques.

J'aimerais remercier sincèrement à l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté mon invitation à examiner mon travail. Mes remerciements s'adressent en particulier au Dr. Hervé SEITZ et Dr. Michel LACASA, qui ont consacré leur temps et leur énergie pour évaluer ce manuscrit et m'ont donné des commentaires pertinents.

J'adresse également mes remerciements à mes collègues de l'équipe, Maryline, Ilham, Feifei, Badia, Thierry, Stanislas et Marie-Hélène, qui m'ont, non seulement beaucoup aidé pour mes expériences, mais aussi soutenu psychologiquement tout au long de ma recherche. Leur présence transforme le laboratoire à une seconde famille pour moi.

Je remercie aussi Dominique et Stéphanie qui m'ont aidé et inspiré durant notre collaboration du projet portant sur l'implication des mitochondries dans la régulation par les microARN.

Un grand remerciement à Gérard, Michael, Sylvie Pillet, Michel, Michelle, Christelle, Marianne, Sylvie Souquere, Christoph, Brigitte et tous les autres collègues sur le site Villejuif, de leurs aides scientifiques et de leur amitié.

Mes remerciements s'adressent aussi à Denis Clay pour ses aides chaleureuses et sa patience pendant les expériences de tri cellulaire, à Patric Tauc et Etienne Henry qui m'ont aidé pour la mise en place des expériences empruntant les méthodes microscopiques.

J'aimerais remercier Muriel de ses aides pour les démarches administratives, et en particulier, d'avoir fait tous ses efforts pour l'organisation des journées pour les étudiants doctorants de l'école doctorale.

Merci aussi à Sylvain Thierry, Frédéric Subra, Anne-Marie Vaudeville, Janine Seite, Marjolaine Vernier et tous les membres de LBPA qui m'a accueilli chaleureusement lors de mon arrivée à l'ENS Cachan.

Finalement, je remercie Liwei, ma femme, qui me soutient et m'inspire avec son énergie positive depuis toujours.

Résumé

Les microARN constituent une classe de petits ARN non codants d'une vingtaine de nucléotides, issus de transcrits cellulaires, qui inhibent l'expression de gènes cibles au niveau post-transcriptionnel. Chez les mammifères, bien qu'ils puissent agir sur une cible parfaitement complémentaire (mode parfait), les microARN ont presque exclusivement des cibles partiellement complémentaires (mode imparfait). Puisqu'en mode imparfait une coupure endonucléolytique de la cible est impossible, il est généralement proposé que le mode imparfait soit moins efficace que le mode parfait : conduisant à un silencing moins efficace, nécessitant plus de complexes effecteurs (miRISC) et facilement saturable par une augmentation du nombre de cible. Dans ce travail j'ai développé une approche expérimentale reposant sur l'expression de protéines fluorescentes pour mesurer précisément le silencing au niveau de chaque cellule. J'ai fait trois observations inattendues sur l'efficacité de la régulation par les microARN : i) le silencing en mode parfait et imparfait nécessite des quantités similaires de petit ARN, ii) une augmentation, même très importante, de l'expression du gène cible ne lui permet pas d'échapper à la régulation, iii) le silencing n'est pas intrinsèquement plus faible en mode imparfait (qu'en mode parfait) mais n'est pas actif dans toutes les cellules. Si les deux premiers points sont facilement explicables dans le cadre de l'induction de la dégradation de l'ARNm cible sur un mode catalytique via la déadénylation de l'ARNm, le troisième indique l'existence d'une régulation forte du silencing qui est spécifique du mode imparfait. De plus, comme dans les deux modes le silencing dépend principalement du même partenaire, Ago2, cette régulation intervient après l'assemblage du complexe minimal (Ago2/petit ARN). Ainsi, les différences entre les modes parfait et imparfait ne se situent pas au niveau proposé puisque lorsque la cellule est compétente, leurs efficacités sont comparables. Par contre, mes travaux mettent en évidence l'existence d'un contrôle de la régulation en mode imparfait dont la nature reste à préciser.

Abstract

microRNAs are endogenous small non-coding RNAs about 21 nucleotides in length that inhibit the expression of target genes primarily at the post-transcriptional level. The target recognition of microRNA is sequence-specific and requires a partial complementarity between the microRNA and target sequences that are present on the mRNA molecules. microRNAs are part of an effector complex, miRISC, containing multiple proteins which can participate to a repression of translation and/or promotes destabilization of the target mRNA. The mechanism of microRNA silencing is not completely understood to date, but it is assumed that it is globally less potent than that of siRNA acting on perfect targets. By using fluorescent proteins expressing reporter plasmids and flow cytometry, we observed an efficient silencing by microRNA which does not require more active complexes than the perfect target silencing and cannot be easily saturated. This suggests that in cells in culture, microRNA silencing works in a catalytic manner leading to mRNA degradation. In addition, our data also indicates that the efficiency of microRNA silencing is variable among cells and can be almost completely abrogated under some conditions contrary to the siRNA silencing which is active in all cells. As we observed that the protein Ago2 is the only member of Ago family that is implicated in the microRNA silencing, it follows that the regulation of microRNA silencing acts after the formation of the core complex (Ago2/small RNA). So the difference between the silencing in the perfect and imperfect mode are not what is usually proposed, but pertain to a level of cellular control, which remains to be deciphered.

Liste d'abréviations

siARN : short interfering RNA

miARN : microRNA

piARN : PIWI interacting RNA

RISC : RNA induced silencing complex

TGS : Transcriptional gene silencing

RITS : RNA induced transcriptional silencing

PIWI : P-element induced wimpy testis

HMGA2 : High mobility group AT-hook protein 2

GW(182) : Glycine (G) Tryptophane (W)

P-bodies : Processing bodies

XRN1 : 5'-3' exoribonuclease 1

DCP1/DCP2 : Decapping protein 1/decapping protein 2

pri-miARN : Primary microRNA

pré-miARN : Precursor microRNA

PAZ : Piwi-Argonaute-Zwille

RLC : RISC loading complex

IRES : Internal ribosomal entry segment

Polysome : Polyribosome

HuR : Human antigen R

Dnd1 : Dead end 1

UPF1 : Up-frameshift 1

PTB : Tract binding protein

C3PO : Component 3 promoter of RISC

CCR4 : chemokine (C-C motif) receptor 4

CAF1 : Chromatin assembly factor 1

NOT : Negative regulator of transcription

PAN2/PAN3 : poly(A) specific ribonuclease subunit homolog 2/3

RRM : RNA-Recognition Motif

PAM-2 : PABPC-interacting Motif 2

UBA : UBiquitin-associated

MVBs : Multivesicular bodies

PABPC ou PABP : Cytoplasmic poly(A) binding protein

CCCP : Carbonyl cyanide *p*-chlorophenylhydrazone

EGFP : Enhanced green fluorescent protein

Nir : Near infrared

TRE : Tet response element (tetracycline response element)

ANOVA : Analysis of Variance

SOMMAIRE

PARTIE I. INTRODUCTION	4
Chapitre I. Petits ARN régulateurs : généralités	6
I. siARN	6
II. microARN.....	9
III. piARN	11
Chapitre II. siARN et interférence par l'ARN	13
I. Maturation des siARN	13
A. Origines des siARN	13
B. Dicer et caractéristiques structurales des siARN	16
II. Complexe RISC, clés de la régulation par les petits ARN	18
A. Protéines Ago	18
B. Assemblage du complexe siRISC	23
III. Reconnaissance et dégradation de l'ARN cible	28
Chapitre III. miARN et régulation par les miARN	31
I. Biogenèse des miARN et assemblage des miRISC.....	32
A. Gènes de miARN et leur transcription.....	32
B. Maturation des miARN	33
C. Assemblage du miRISC	36
D. Reconnaissance de la cible.....	39
II. Régulation par les miARN.....	41
A. Inhibition de la traduction	43
B. Dégradation et déadénylation de l'ARNm cible	45
C. Protéines GW182/TNRC6	48
D. Efficacité de la régulation par les miARN	54
PARTIE II. RESULTATS	61
Chapitre I. Etude comparative du silencing en mode siARN et en mode miARN	63
I. Caractérisation du silencing en mode miARN par les protéines rapporteuses fluorescentes	63
A. Présentation générale du système expérimental.....	63
B. Efficacité moyenne et spécificité du silencing.....	67

C. Dose-réponse et dose efficace 50.....	69
D. L'efficacité de la régulation par les miARN est pratiquement indépendante du niveau d'expression du gène cible	74
E. Les miARN induisent la dégradation des ARNm cible	78
Chapitre II. Variabilité de la régulation en mode miARN au sein de la population cellulaire.....	81
I. Analyse des données de cytométrie : nuages de points et histogrammes	82
II. Hétérogénéité de la régulation par les miARN chez les cellules HEK293 Tet-On	85
A. Mise en évidence de cellules dans lesquelles l'expression du gène cible n'est pas affectée par le silencing en mode miARN	85
B. Les « cellules résistantes » ont été transfectées par les petits ARN	88
C. Niveau réel de la régulation en mode miARN est élevé	91
III. Hétérogénéité de la régulation par les miARN chez d'autres lignées cellulaires	95
A. Hétérogénéité de la régulation par les miARN chez les cellules U2OS Tet-On	96
B. Hétérogénéité de la régulation par les miARN chez les cellules HeLa	98
Chapitre III. Facteurs affectant la régulation en mode miARN.....	102
I. La résistance à la régulation par les miARN n'est pas un caractère stable	102
A. Sélection et validation des clones stables HEK293 Tet-On.....	103
B. Les cellules « résistantes » sont compétentes pour la régulation en mode miARN	107
II. Cycle cellulaire et régulation par les miARN	111
A. Les cellules résistantes à la régulation en mode miARN sont plus abondantes dans les cellules de petite taille	112
B. Les cellules résistantes à la régulation en mode miARN sont moins fréquentes parmi les cellules en phase S-G2/M.....	115
III. Activité des miARN est liée au réseau mitochondrial	122
Chapitre IV. Contribution des protéines Ago à la régulation en mode miARN	124
I. Approches expérimentales	124
II. Ago2 est important pour la régulation induite par les précurseurs de miARN.....	127
PARTIE III. DISCUSSIONS	130
I. Régulation par les miARN : efficacité et mécanisme	130
II. Variabilité du silencing en mode miARN.....	139

SOMMAIRE

A. Découverte des cellules résistantes à la régulation par les miARN	139
B. Origine des cellules résistantes	143
PARTIE IV. MATERIELS ET METHODES	147
I. Biologie Cellulaire	147
A. Lignées cellulaires.....	147
B. Culture cellulaire.....	148
C. Transfection	148
D. Construction de clones stables HEK293 Tet-On	150
E. Détection des protéines fluorescentes par cytométrie en flux.....	150
F. Tri des cellules.....	153
II. Biologie moléculaire.....	154
A. Plasmides	154
B. siARN.....	159
C. Extraction d'ARN	161
D. Analyse d'ARN par RT-PCR quantitative.....	162
ANNEXES.....	164
BIBLIOGRAPHIE.....	171

PARTIE I. INTRODUCTION

En 1998, les équipes d'Andrew Fire et de Craig Mello ont décrit le phénomène de l'interférence par l'ARN chez *C. elegans*. L'observation était que l'introduction d'ARN double-brin qui portent une séquence identique à celle d'un ARNm (d'un gène endogène ou d'un transgène) est capable d'induire une diminution considérable de la quantité du transcrit ciblé et de générer un phénotype proche de celui d'un allèle nul chez les nématodes (Fire et al. 1998). Cette régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes par les petits ARN double-brin a rapidement été retrouvée chez presque tous les organismes eucaryotes, une exception étant la levure *S. cerevisiae* qui a probablement perdu cette voie de régulation (Aravind et al. 2000). En quelques années l'interférence par l'ARN est devenue un outil essentiel pour étudier la fonction des gènes pour lesquels on ne possède pas de mutant génétique.

Cette observation, au départ réellement inattendue, s'est progressivement inscrite dans le cadre des études sur les rôles des ARN non codants. Il est intéressant de remarquer que c'est aussi chez *C. elegans* qu'avait été identifié un gène important pour le développement, *lin-4*, dont le produit était un petit ARN de 21 nucléotides. De plus les études génétiques avaient permis de préciser le rôle du « microARN » *lin-4* en observant que c'était un régulateur négatif de l'expression au niveau post-transcriptionnel qui agissait via des cibles partiellement complémentaires présentes dans la région 3' non traduite de certains ARNm. La mise en évidence de la conservation chez les mammifères du microARN *let-7* et les similarités entre l'interférence par l'ARN et la régulation par les microARN ont conduit à une vision plus large de la régulation par les ARN non codants qui regroupe une famille de mécanismes impliquant des petits ARN guides d'une vingtaine de nucléotides pour conférer une spécificité de séquence à une activité biologique.

Chez les eucaryotes, il existe plusieurs types de petits ARN régulateurs endogènes, ces petits ARN sont classés dans 3 catégories majeurs selon leur nature, leur mode d'action et leur cofacteurs : les siARN (small interfering RNA), les miARN (microARN) et les piARN (PIWI interacting RNA) (Siomi et al. 2011). Les siARN sont issus d'ARN double-brin longs ou des longues tige-boucles sur des transcrits. Les siARN endogènes partagent les caractéristiques des siARN artificiellement synthétisés et peuvent induire la dégradation

INTRODUCTION

par coupure de transcrits ayant des séquences cibles parfaitement complémentaires. Les miARN sont générés à partir d'ARN précurseurs comportant une tige-boucle généralement imparfaite et, chez les animaux, ils interagissent le plus souvent avec leur ARNm cibles via des séquences partiellement complémentaires. Les miARN sont capables de réprimer l'expression de leurs cibles au niveau protéique sans altérer systématiquement l'abondance de l'ARNm. La maturation des siARN et miARN est dépendante de la protéine Dicer et leurs activités biologiques sont établies via les protéines de la famille Argonaute. Les piARN sont un peu plus longs que les siARN et miARN (27-30 nt au lieu de 20-23 nt) et leur biogenèse suit une voie distincte tandis que leur fonctionnalité dépend des protéines PIWI (**P**-element **I**nduced **W**impy testis), une sous famille spécifique de la famille Argonaute et qui n'a été observée que dans le règne animal.

A ce jour, le mécanisme de l'interférence par l'ARN sur des cibles parfaites est assez bien décrit et, au moins *in vitro*, il a été clairement établi que la dégradation des ARNm cibles est un processus catalytique pouvant conduire à un silencing très efficace. Par contre, le mécanisme de la régulation par les miARN est encore mal connu même si sur les deux dernières années (2011-2012), des progrès substantiels ont été accomplis. Ceci est à contraster avec une littérature très abondante sur les effets biologiques des miARN mais qui peine à conclure sur la place exacte des miARN au sein des autres régulations de l'expression. L'image générale qui est habituellement proposée est que l'amplitude de la régulation par les miARN est modeste (de 50 à 70 % de diminution protéique) et met en cause de nombreux partenaires protéiques des protéines Argonaute. Cette multiplicité de partenaires contribue probablement à la difficulté d'identifier le mécanisme de la régulation. Les miARN sont donc considérés comme des régulateurs complémentaires qui affinent la régulation de l'expression génétique. De plus en plus de données impliquent les miARN dans de nombreux processus biologiques normaux et pathologiques et en particulier la tumorigenèse. Ceci suggère la perspective d'applications thérapeutiques des miARN dans de nombreuses maladies et une compréhension du mécanisme de la régulation par les miARN est donc absolument nécessaire.

Mon travail porte sur la comparaison de l'action post-transcriptionnelle des siARN et des miARN chez les mammifères et l'étude précise de l'efficacité de la régulation par les miARN. Comme ces deux petits ARN régulateurs partagent certains effecteurs, cette comparaison contribuera à la compréhension de mode d'action des miARN.

Chapitre I. Petits ARN régulateurs : généralités

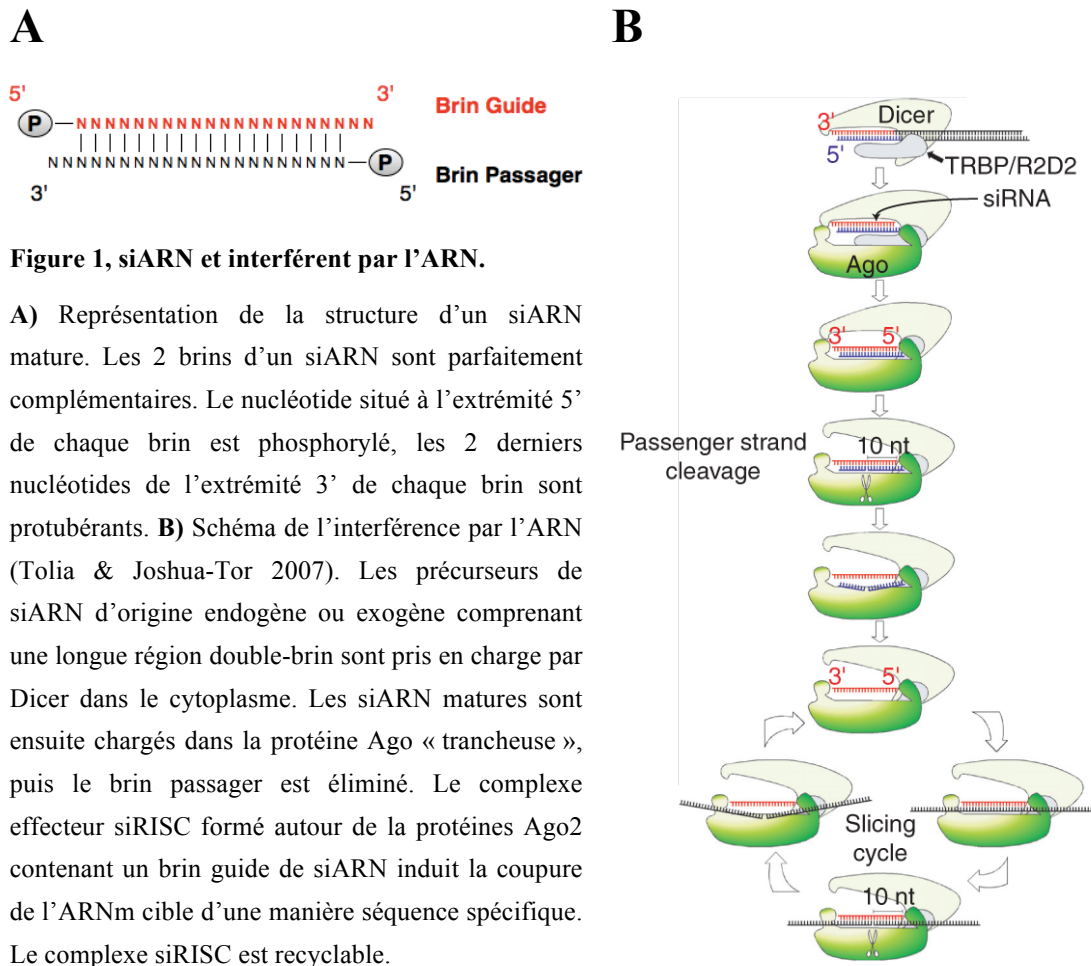
Les petits ARN régulateurs existent chez les procaryotes comme les eucaryotes mais dans ce manuscrit je discuterai seulement les petits ARN régulateurs des eucaryotes dont l'activité biologique nécessite la participation des protéines de la famille Argonaute.

La longueur de ces petits ARN régulateurs varie entre une vingtaine et une trentaine de nucléotides. Ils ne codent pour aucune protéine ou du moins vu leur taille ne comprennent généralement ni codon d'initiation, ni codon stop. Ils sont issus de la maturation d'ARN précurseurs plus longs et cette maturation a lieu dans le noyau et dans le cytoplasme. Les petits ARN régulateurs sont actifs sous forme simple brin puisqu'ils permettent la reconnaissance d'ARN cellulaires par l'appariement Watson-Crick. Cette association avec un ARN cible permet, à travers les protéines associées au petit ARN, de modifier le devenir de ce transcrit. La principale activité biologique associée est une diminution de l'expression lorsque la cible est un ARNm. Les extrémités de ces petits ARN portent des modifications qui peuvent influencer sur leur stabilité et sont compatibles avec leur interaction avec les facteurs qui les prennent en charge. A cause de la longueur et de la possibilité d'interagir avec des cibles partiellement complémentaires, un petit ARN donné peut avoir plusieurs cibles et ainsi ajuster l'expression d'un très grand nombre de gènes. Ce chapitre présente une introduction générale sur les trois principales classes de petits ARN régulateurs : siARN, miARN et piARN.

I. siARN

Le nom siARN signifie « small interfering RNA », ce sont des petits ARN double-brin d'environ 21 nucléotides, impliqués dans l'interférence par l'ARN. Les siARN matures consistent en deux brins parfaitement complémentaires sur environ 19 nucléotides avec 2 nucléotides libres sur chacune des extrémités 3'. Le nucléotide situé à l'extrémité 5' doit être phosphorylé pour permettre son interaction avec les protéines Ago (les protéines d'une sous-famille de la famille Argonaute), les seuls facteurs qui interagissent directement avec les siARN et miARN. Les données cristallographiques des protéines Ago permettent de comprendre le rôle de ces caractéristiques dans une interaction spécifique entre les siARN

et les protéines Ago (Frank et al. 2010; Lingel et al. 2003; Ma et al. 2004; J. S. Parker et al. 2005; J.-J. Song et al. 2003; Y. Wang, Juranek, et al. 2008a; Y. Wang, Sheng, et al. 2008b; Y. Wang et al. 2009b; Yan et al. 2003). Un siARN mature est illustré par la Figure 1A.



Les siARN matures sont générés à partir des ARN double-brin longs d'origine endogène ou exogène. En association avec une protéine Ago « trancheuse » (slicer en anglais, qui possède l'activité endonucléolytique et peut couper un ARN simple-brin), un siARN est capable d'inhiber l'expression d'un gène cible dès lors qu'il porte une séquence parfaitement complémentaire avec le brin guide de siARN dans son ARNm. La mise en place de l'interférence par l'ARN est schématisée dans la Figure 1B (Tolia & Joshua-Tor 2007). En bref, les ARN double-brin longs sont coupés par Dicer, une RNase III, en siARN double-brin d'environ 21 nucléotides. Ces siARN double-brin sont incorporés dans la protéine Ago trancheuse, une sélection du brin en fonction de la stabilité d'appariement des nucléotides aux extrémités 5' a lieu au moment de l'incorporation, le brin dont l'extrémité 5' est moins stable est retenu préférentiellement comme le brin guide

(Khvorova et al. 2003; Schwarz et al. 2003), l'autre brin sera éliminé après une coupure induite par la protéine Ago (Leuschner et al. 2006; Matranga et al. 2005; Rand et al. 2005). Un tel complexe comprenant un brin guide de petit ARN, une protéine Ago et les facteurs qu'elle recrute est appelé RISC (RNA Induced Silencing Complex). Le brin guide du siARN permet le recrutement du complexe siRISC sur les molécules d'ARNm cibles par une complémentarité de type Watson-Crick, la protéine Ago est capable de couper l'ARNm situé en face du brin guide par son activité endonucléolytique et libère le produit découpé. Les ARNm ainsi découpés vont être dégradés par les exonucléases 5' et 3'. Dans ce cycle, le complexe siRISC peut-être recyclé sous une forme intacte et ainsi avoir une activité catalytique (Haley & Zamore 2004; Hutvagner & Zamore 2002; Tolia & Joshua-Tor 2007). Ce mécanisme catalytique assure une efficacité élevée de la dégradation des ARNm et par là d'inhibition de l'expression du gène cible.

La majorité des données dans la littérature démontre la fonction des siARN dans le cytoplasme, au niveau post-transcriptionnel, cependant, de plus en plus d'études mettent en évidence une activité nucléaire qui peut être post-transcriptionnelle ou transcriptionnelle. Dans ce deuxième cas, on peut observer des modifications sur la chromatine au voisinage du site de reconnaissance du siARN et la transcription du gène cible est alors altérée (Tolia & Joshua-Tor 2007). Ce phénomène est connu par le nom TGS (Transcriptional Gene Silencing). Chez *S. pombe* où ce type de régulation a été étudiée en grand détail, elle met toujours en cause une protéine Ago mais nécessite d'autres cofacteurs que ceux impliqués dans les activités post-transcriptionnelles, le complexe RITS (RNA Induced Transcriptional Silencing Complex).

A ce jour, les siARN constituent un outil simple et efficace pour les études de génétique inverse où l'on cherche à définir la fonction d'un gène donné. En principe il suffit de connaître la séquence du gène d'intérêt pour concevoir des siARN contre différentes parties de l'ARNm et inhiber son niveau d'expression. Un siARN peut ainsi diminuer l'expression protéique de plus de 70 % et mimer un allèle faible. Même si le silencing n'est pas totale et présente des effets secondaires, c'est une approche beaucoup plus accessible que celles de la génétique chez les mammifères.

II. microARN

Les miARN (microARN) sont une autre population de petits ARN régulateurs qui est similaire à celle des siARN en terme de structure biochimique mais diffère par leur biogenèse et leur mode d'action. Globalement, un duplex miARN mature a une structure proche de celle d'un siARN, avec une région appariée d'une vingtaine de nucléotides, des extrémité 5' phosphorylées et deux nucléotides libres en 3' de chaque brin. Toutefois des mésappariements sont presque toujours présents au sein de la structure double-brin (Fig. 2A).

A

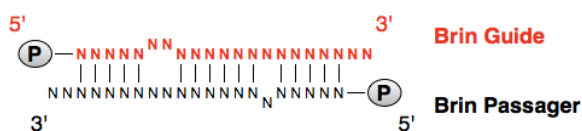
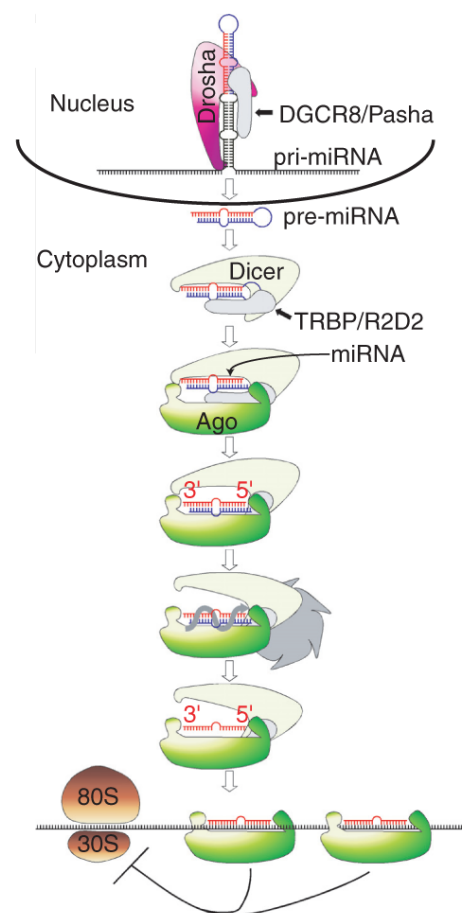


Figure 2, miARN et régulation par les miARN. A) Représentation de la structure d'un duplex miARN. Le nucléotide situé à l'extrémité 5' de chaque brin est phosphorylé, les 2 derniers nucléotides de l'extrémité 3' de chaque brin sont en surplomb. L'hybridation entre les 2 brins d'un miARN n'est pas complète, des mésappariements existent. **B)** Schéma de la régulation par les miARN (Tolia & Joshua-Tor 2007). Dans le noyau, les pri-miARN (primary miRNA) sont des transcrits de l'ARN polymérase II présentant des structures en tige-boucle qui sont excisés par Drosha. Après leur exportation dans le cytoplasme, ces pré-miARN (precursor miRNA) sont pris en charge par Dicer qui couple la boucle tandis que la tige est incorporée dans une protéine Ago en tant que miARN mature. Le brin passager est éliminé par la dissociation. Chez les mammifères, les miARN peuvent inhiber la traduction de l'ARNm cible ou altérer leur stabilité ; dans certains cas où le miARN est parfaitement complémentaire avec sa cible, il peut induire une coupure endonucléolytique de sa cible.

B



Malgré la similarité importante entre les siARN et les miARN, leur origine et leur mode d'action sont très différents. La Figure 2B (Tolia & Joshua-Tor 2007) donne un schéma simplifié de la biogenèse et du mode d'action des miARN. Les miARN sont générés à partir des précurseurs de miARN (pré-miARN) qui sont des tige-boucles présentes sur des transcrits cellulaires. A l'exception du cas de miR-451 (Cheloufi et al. 2010; Cifuentes et al. 2010; J.-S. Yang et al. 2010), les pré-miARN sont maturés en miARN par Dicer, et peuvent ensuite être incorporés dans une protéine Ago. A cause des mésappariements entre les deux brins, l'élimination du brin passager ne peut s'effectuer par la coupure mais par un mécanisme de dissociation (Haley & Zamore 2004; Hutvagner & Zamore 2002; Kawamata & Tomari 2010). Dans le règne animal, sauf dans quelques cas exceptionnels, les miARN guident le complexe RISC sur les molécules d'ARNm cibles par une complémentarité partielle de séquence entre eux. Les miARN n'induisent pas une coupure endonucléolytique de leurs cibles à cause des mésappariements et leur effet répressif sur l'expression du gène cible est assuré par l'inhibition de la traduction du transcrit ciblé ou sa déstabilisation via la déadénylation. Même si le silencing par les miARN peut affecter la stabilité des transcrits du gène cible, ce mécanisme apparaît comme indirect et est considéré comme moins efficace que celui de la coupure par siARN sur une cible parfaite.

Les séquences cibles des miARN sont principalement présentes dans la région 3' non codante d'un ARNm, mais il existe des cibles naturelles fonctionnelles dans la région codante (Brodersen & Voinnet 2009). Dans le cas des siARN, une seule cible dans l'ARNm est suffisante pour mettre en place une régulation forte, mais dans les cas des miARN, on observe souvent la présence de plusieurs sites pour le même miARN comme dans l'exemple d'HMGA2 qui porte 7 sites pour miARN *let-7* dans sa région 3' non traduite (Mayr et al. 2007). De plus, un ARNm peut contenir des sites pour plusieurs miARN différents. L'interprétation la plus simple de cette multiplicité des sites est qu'elle permet l'établissement d'un silencing plus efficace à travers un effet coopératif entre les complexes RISC recrutés sur le même ARNm (Broderick et al. 2011). La région 3' non codante d'un ARNm contient souvent des sites de fixation pour d'autres facteurs qui contrôlent sa stabilité et sa traduction, il est donc possible que les miARN coopèrent non seulement entre eux, mais aussi avec d'autres mécanismes de régulation post-transcriptionnelle.

Le niveau de complémentarité entre un petit ARN régulateur et sa cible est l'un des facteurs déterminants du mode d'action de ce petit ARN : si la complémentarité est parfaite, le petit ARN fonctionne en mode siARN (mode parfait), il induit une coupure endonucléolytique de sa cible par la protéine Ago, qui sera suivie d'une dégradation rapide des fragments ; si la complémentarité n'est pas parfaite, le petit ARN fonctionne en mode miARN (mode imparfait) sans coupure endonucléolytique de la cible, le niveau global de la traduction de l'ARNm cible est diminué par les autres facteurs du complexe miRISC. Les siARN et les miARN fonctionnent tous sous forme simple brin dans les complexes effecteurs, ils ont des caractéristiques physico-chimiques quasiment identiques et la même molécule de petit ARN peut changer son mode d'action si la complémentarité petit ARN/cible est modifiée. Cette propriété des petits ARN régulateurs est très utile du point de vue expérimental, puisque le même petit ARN introduit sous forme d'un duplex parfaitement apparié (comme celui d'un siARN, Fig. 1A) dans les cellules est capable d'induire l'un ou l'autre type de régulation en fonction de la complémentarité entre le brin guide et la séquence ciblée. Cette stratégie a été largement utilisée dans mes travaux pour comparer l'efficacité de la régulation dans les deux modes.

III. piARN

Une troisième catégorie majeure de petits ARN régulateurs est celle des piARN (PIWI Interacting RNA, ici PIWI signifie **P**-element **I**nduced **W**impy testis). Plusieurs aspects de leur genèse et de leur mode d'action font que les piARN constituent un groupe nettement distinct des deux autres groupes (siARN et miARN). Leur taille est plus grande, elle varie de 21 à 31 nucléotides. Leur voie de biogenèse ne dépend pas de la protéine Dicer, mais des protéines PIWI, une sous-famille de la famille Argonaute qui n'existe que dans le règne animal et dont l'expression est restreinte aux lignées germinales chez les mammifères. Leur fonction biologique dépend aussi des protéines PIWI et ils sont impliqués dans l'inhibition des éléments transposables dans les lignées germinales (Siomi et al. 2011).

Les piARN sont principalement issus de régions génomiques particulières, les « clusters de piARN ». La taille de ces clusters est variable mais ils sont riches en séquences complètes ou tronquées d'éléments transposables (Aravin, Hannon, et al. 2007a; Aravin et al. 2008; Brennecke et al. 2007) et la majorité des piARN est capable de s'hybrider avec ces

éléments. Les précurseurs des piARN sont sous forme simple-brin, les détails de leur biogenèse restent à être clarifiés. Ces précurseurs sont traités par les protéines PIWI et PIWI-like en donnant des piARN primaires (entre 21 et 31 nucléotides). Les complexes piRISC, contenant un piARN primaire, des protéines de la sous famille PIWI et des cofacteurs, reconnaissent les éléments transposables par la complémentarité des séquences et peuvent couper leur cible de manière endonucléolytique en générant des piARN secondaires qui constituent des nouveaux piRISC. Ces piRISC secondaires ciblent les transcrits complémentaires des mêmes éléments transposables, ce qui génère des nouveaux piARN. Cette boucle d'amplification (appelée le cycle Ping-Pong) est une étape importante de la biogenèse des piARN et est essentielle pour l'inhibition de l'activité des éléments transposables (Fig. 3). La régulation par les piARN est considérée comme un mécanisme de défense contre les éléments transposables afin de maintenir l'intégrité du génome dans les lignées germinales.

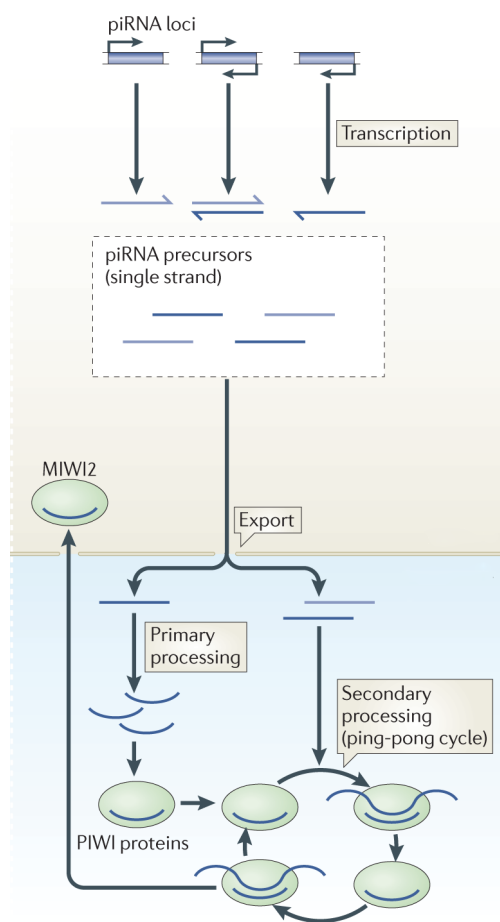


Figure 3, Biogenèse des piARN.

Schéma de la biogenèse de piARN (Siomi et al. 2011). Les précurseurs simple-brin des piARN sont transcrits à partir des clusters de piARN riches en séquences d'éléments transposables, ils sont ensuite exportés dans le cytoplasme où ils interagissent avec les différentes protéines membres de la sous-famille PIWI afin de dégrader les transcrits sens et antisens des éléments transposables par le cycle Ping-Pong et de s'amplifier en même temps. Chez la souris, des piARN et les protéines PIWI, sont supposés être impliqués dans la méthylation des rétrotransposons (Aravin, Sachidanandam, et al. 2007b; Kuramochi-Miyagawa et al. 2008).

Chapitre II. siARN et interférence par l'ARN

L'effet majeur d'un siARN est l'inhibition de l'expression du gène cible par la dégradation de son ARNm. Bien qu'il existe des données qui montrent l'implication des siARN dans des régulations au niveau transcriptionnel accompagnée par des modifications de la chromatine (Morris et al. 2004), le mécanisme et l'importance de ce type de régulation sont encore mal connus chez les mammifères. La majorité des études concernant les siARN, leurs modes d'action et leurs applications est donc centrée sur leurs fonctions post-transcriptionnelles.

L'inhibition post-transcriptionnelle de l'expression induite par un siARN correspond à ce qui est le plus souvent désigné par l'application « interférence par l'ARN ». Ce mécanisme existe chez presque tous les eucaryotes sauf chez *S. cerevisiae*, ce qui suggère qu'il y a été perdu (Drinnenberg et al. 2009). L'interférence par l'ARN met en œuvre plusieurs événements successifs : l'assemblage du complexe effecteur RISC, la reconnaissance de l'ARN cible, la coupure endonucléolytique de l'ARNm cible, la libération de l'ARNm coupé. Après avoir coupé et libéré la première cible, un complexe RISC peut prendre en charge un autre ARNm cible (Haley & Zamore 2004; Hutvagner & Zamore 2002). Les données existantes sont en faveur d'un mode d'action catalytique du complexe siRISC, ce qui contribue à l'efficacité du silencing.

I. Maturation des siARN

A. Origines des siARN

Il existe plusieurs sources possibles de siARN endogènes : les ARN double-brin longs, les transcrits à structure tige-boucle ou les ARN aberrants. Les ARN double-brin longs se forment par l'hybridation entre des transcrits sens et antisens. Les transcrits antisens peuvent avoir plusieurs origines : une transcription convergente au niveau d'un *locus*, la transcription antisens de transposons ou d'autres séquences localement répétées, des pseudogènes dupliqués et inversés, l'hybridation entre un transcrit codant et le transcrit antisens d'un pseudogène via une interaction en *trans* (Chung et al. 2008; Czech et al. 2008; Ghildiyal et al. 2008; Ghildiyal & Zamore 2009; Okamura, Balla, et al. 2008a; Tam

INTRODUCTION

siARN et interférence par l'ARN

Maturation des siARN : Origine des siARN

et al. 2008). Les ARN endogènes à structure tige-boucle qui peuvent donner naissance à des siARN possèdent une tige longue (souvent supérieure ou égale à une centaine de nucléotides) contenant souvent des mésappariements modestes, ils sont différents des pré-miARN dont la tige est plus courte et contient des mésappariements plus considérables (typiquement une tige d'une trentaine de nucléotides). Ces ARN avec de longues tige-boucles sont issus de régions du génome comportant des séquences répétées et inversées (Okamura, Chung, et al. 2008b). En plus de précurseurs de siARN endogènes, les siARN sont aussi générés à partir de sources exogènes, par exemple les ARN double-brin obtenus par une infection virale ou une transfection. Tous ces précurseurs de siARN, ont en commun une structure double-brin longue, qui va être transformée en siARN d'une vingtaine de nucléotides au cours de leur maturation. La Figure 4 (Siomi et al. 2011) résume les différentes sources de siARN et un schéma bref de sa maturation.

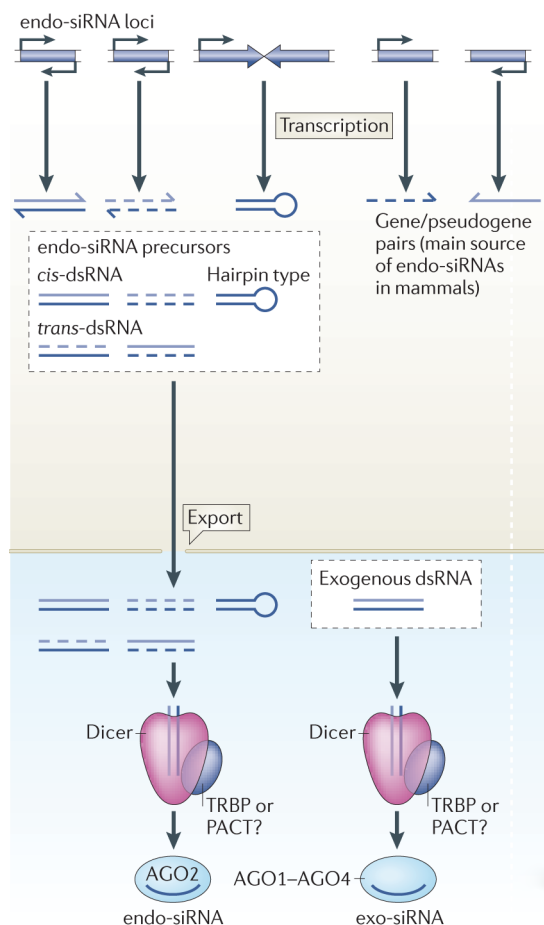


Figure 4, Les siARN endogènes et leur biogenèse.

Schéma de la biogenèse des siARN (Siomi et al. 2011). Les précurseurs de siARN endogènes sont des ARN double-brin issus de différents types de *loci* génomique, ils sont exportés dans le cytoplasme où ils sont pris en charge par Dicer. Les siARN endogènes matures sont ensuite incorporés dans la protéine Ago2, puis le brin passager est éliminé. Les ARN double-brin exogènes introduits directement dans le cytoplasme (par une infection virale ou une transfection) sont aussi pris en charge par Dicer pour la maturation. Chez les mammifères, les siARN exogènes matures s'incorporent dans toutes les protéines Ago (Ago1 à Ago4), pourtant, seuls les complexes avec Ago2 sont fonctionnels pour l'interférence par l'ARN.

Sauf chez les mammifères, ces précurseurs endogènes des siARN sont exportés du noyau vers le cytoplasme où ils vont être pris en charge par une protéine de type RNase III appelée Dicer, cette protéine coupe les ARN double-brin (ou les régions à structure ARN double-brin) en petits ARN d'une longueur d'environ 21 nucléotides, laissant les 2 derniers nucléotides de chaque brin en surplomb. Les ARN double-brin d'origine exogène sont traités d'une même manière par Dicer mais dans ce cas ils sont directement introduits dans le cytoplasme (par une infection virale ou une transfection). Dans le cas des mammifères, et probablement du fait de l'existence de la réponse interféron qui est déclenchée dans le cytoplasme par la présence d'ARN double-brin, il existe un mode de rétention dans le noyau des ARN double-brin au niveau des « paraspeckles » (L.-L. Chen & Carmichael 2009). On peut signaler que des siARN endogènes ont été décrits dans les cellules embryonnaires de souris où ni la réponse interféron ni la rétention nucléaire des ARN double-brin ne sont actives (R. Song et al. 2011; Watanabe et al. 2008).

Les siARN matures sont incorporés dans une protéine Ago (de la famille Argonaute), puis le brin passager est dégradé tandis que le brin guide est conservé. L'appariement entre le brin guide et un ARN cellulaire va permettre de guider la protéine Ago et les protéines qui lui sont associées au sein du complexe RISC (« RNA Induced Silencing Complex ») sur les ARN cibles. Cette interaction entre les protéines Ago et le brin guide n'est pas covalente et la stabilité du complexe est mal connue. Tous les petits ARN double-brin possédant des caractères clés de siARN (extrémité 5' phosphorylée, présence de deux nucléotides libres en 3', longueur d'une vingtaine de nt) peuvent être intégrés dans les protéines Ago. Les siARN synthétisés chimiquement et présentant cette structure globale peuvent être incorporés dans le complexe RISC et y avoir les mêmes activités biologiques que celles des siARN endogènes. Dans ce cas l'extrémité 5' qui au départ est un groupement OH est rapidement phosphorylée par la kinase Clp1 (Weitzer & Martinez 2007). Chez les mammifères les siARN endogènes sont incorporés dans la protéine Ago2 (un membre des protéines Ago), cependant, il n'y a pas d'évidence qui exclut qu'ils soient pris en charge par d'autres protéines Ago (Ago 1, 3 ou 4). Les siARN provenant des ARN double-brin exogènes s'intègrent dans toutes les protéines Ago, mais seulement les complexes formés autour d'Ago2 est impliqués dans l'interférence par l'ARN (Siomi et al. 2011).

B. Dicer et caractéristiques structurales des siARN

La biogenèse des siARN nécessite la protéine Dicer qui fait partie de la famille des RNases III. Dicer prend en charge des ARN double-brin et les coupe en fragments d'une vingtaine de nucléotides, toujours double-brin, portant les extrémités appropriées pour leur intégration dans les protéines Ago (5' phosphorylée et 2 nucléotides protubérants en 3').

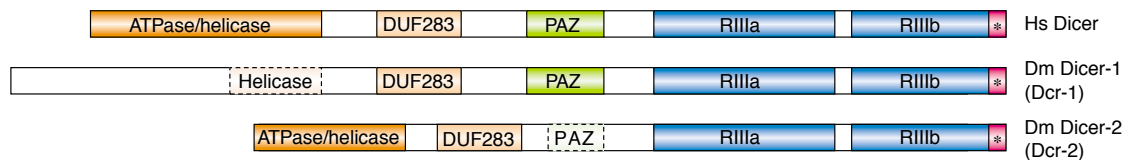


Figure 5, Schéma de l'organisation de Dicer (Filipowicz et al. 2005). Les protéines Dicer humaine et de la Drosophile partagent une organisation spatiale similaire : un domaine d'ATPase/hélicase dans la partie N-terminale (bloc orange), Dcr-1 de Drosophile ne contient que la partie C-terminale de ce domaine ; un domaine DUF dont la fonction est inconnue (bloc ivoire) ; un domaine PAZ au milieu de la molécule (bloc vert), le domaine PAZ de Dcr-2 de Drosophile a divergé au cours de l'évolution ; 2 domaines de RNase III (RIIIa et RIIIb) dans la partie C-terminale (blocs bleus) ; un domaine dsRBD pour l'interaction avec l'ARN double-brin à C-terminale (bloc rouge).

L'organisation de Dicer est illustrée dans la Figure 5. Elle a une masse moléculaire de 200 kDA et contient un domaine ATPase/ARN hélicase dans la partie N-terminale, un domaine PAZ (**P**iwi-**A**rgonaute-**Z**wille) au milieu, deux domaines RNase III du côté C-terminal et un domaine dsRBD (**d**ouble **s**tranded **R**NA **B**inding **D**omain) pour l'interaction avec l'ARN double-brin (Carmell & Hannon 2004). Chez la Drosophile, deux homologues de Dicer sont présents, Dcr-1 est responsable de la biogenèse des miARN tandis que Dcr-2 génère les siARN (Y. S. Lee et al. 2004b; Pham et al. 2004). Chez les vertébrés, une seule enzyme Dicer est responsable de la genèse des deux classes de petits ARN (Fig. 5).

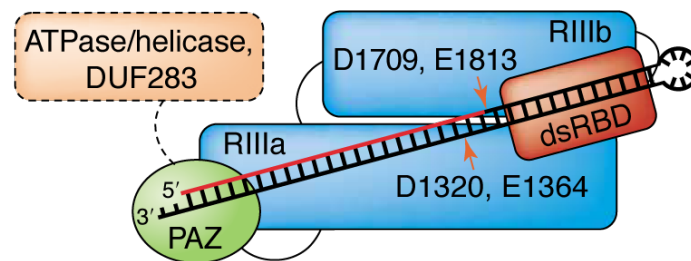


Figure 6, **Schéma de la coupure d'ARN double-brin par Dicer** (Filipowicz et al. 2005). Le domaine PAZ (vert) du Dicer reconnaît les molécules ARN double-brin avec 2 nucléotides 3' en surplomb à l'extrémité. Le domaine dsRBD (rouge) interagit avec l'ARN double-brin et stabilise la molécule d'ARN dans la protéine. Le domaine ATPase/hélicase (orange) optimise la conformation de la molécule ARN double-brin pour la coupure. Les 2 domaines RNase III (bleu) forment un centre de réaction, les 2 sites catalytiques (D1320, E1364 de RNase IIIa et D1709, E1813 de RNase IIIb) coupent chacun un brin de l'ARN double-brin en laissant les 2 derniers nucléotides de l'extrémité 3' non hybridés.

Dicer, avec ses deux domaines RNase III, fonctionne en monomère pour assurer la coupure de l'ARN double brin (Fig. 6). Le domaine PAZ permet la reconnaissance spécifique des extrémités d'une structure d'ARN double-brin avec 2 nucléotides de l'extrémité 3' non hybridés (le domaine PAZ des protéines Ago remplit une fonction identique). Le centre catalytique est constitué des deux domaines RNase III de la même molécule positionnés par le repliement de la protéine (Carmell & Hannon 2004; Meister & Tuschl 2004). Chaque domaine RNase III porte un site catalytique qui coupe un brin du duplex ARN en laissant le groupe phosphate sur le nucléotide à l'extrémité 5'. Le positionnement des deux domaines assure que la coupure a lieu de manière décalée sur les deux brins (Fig. 6) et génère ainsi les 2 nucléotides de l'extrémité 3' protubérantes (Zhang et al. 2004). Le domaine PAZ, à travers son interaction avec l'extrémité 3' du substrat, permet son positionnement précis par rapport au centre catalytique et définit ainsi la taille des fragments générés. Chez les mammifères, la taille des produits de Dicer est d'environ 21 nucléotides (Carmell & Hannon 2004; Zhang et al. 2004; Zhang et al. 2002). Le domaine dsRBD est chargé de maintenir une interaction stable entre Dicer et la molécule d'ARN. Ce domaine est présent dans d'autres protéines qui prennent en charge des ARN double-brin (Carmell & Hannon 2004). Bien que la coupure de l'ARN double-brin soit un processus ATP-indépendant (Zhang et al. 2002), l'établissement de la conformation de

l'ARN double-brin nécessaire à la coupure consomme de l'ATP car il nécessite la participation du domaine ATP/ARN hélicase (Y. S. Lee et al. 2009).

En plus de son rôle dans la genèse des siARN et des miARN, Dicer est aussi impliqué dans l'assemblage du complexe siRISC. Chez la Drosophile, DmDcr-2, en interaction avec d'autres protéines, présente les siARN à DmAgo2 (Q. Liu et al. 2003; Pham et al. 2004; Tomari, Du, et al. 2004a). Comme il n'y a qu'une seule protéine Dicer chez les vertébrés et les nématodes, il est possible que Dicer s'associe avec des cofacteurs différents afin de générer ces deux types de petits ARN et éventuellement de les présenter aux protéines Ago (Filipowicz et al. 2005) ; mais globalement, la spécialisation des voies de biogenèse des siARN et des miARN et des complexes RISC correspondants qui est observée chez la Drosophile ne semble pas exister chez les mammifères.

II. Complexe RISC, clés de la régulation par les petits ARN

A. Protéines Ago

Les petits ARN double-brin mature (siARN ou miARN) ne possèdent pas d'activité catalytique propre et leurs activités biologiques dépendent de la formation de complexes effecteurs, RISC (**R**NA **I**nduced **S**ilencing **C**omplex), avec des facteurs protéiques. La nature exacte du complexe RISC reste à définir, particulièrement dans le contexte *in vivo*. Par des approches biochimiques, on peut purifier et caractériser des complexes RISC, mais leur nature dépend des conditions utilisées (Höck et al. 2007). Cependant, dans toutes les purifications d'un complexe RISC, on observe la présence d'une protéine Ago (de la sous-famille Ago, par opposition avec les piARN qui sont associés avec les membres de la sous-famille PIWI) en plus d'un petit ARN. Il a été montré ensuite que le petit ARN est en interaction directe avec la protéine Ago qui constitue donc l'élément central du complexe RISC sur lequel s'assemblent les autres constituants.

Les protéines Ago appartiennent à la famille Argonaute, une famille de protéines qui jouent des rôles importants dans le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire et le maintien des cellules souches (Peters & Meister 2007). Du fait de leur interaction directe avec les petits ARN, les protéines de la famille sont les facteurs clés de la régulation induite par les siARN et les miARN. Le nombre des gènes d'Argonaute varie entre 1 et 27 selon les espèces (Peters & Meister 2007). Ces protéines sont classées en

deux sous-familles en fonction de la similarité de séquence : les protéines de la sous-famille Ago et celles de la sous-famille PIWI. Chez les mammifères, les protéines Ago sont exprimées dans toutes les cellules et prennent en charge les siARN et les miARN, tandis que les protéines PIWI, dont l'expression est limitée aux lignées germinales, n'interagissent qu'avec les piARN (Meister et al. 2004; Meister & Tuschl 2004; Peters & Meister 2007; Sasaki et al. 2003).

Chez la drosophile, la sous-famille Ago comprend deux membres dont les fonctions sont spécifiques : Ago1 est associée aux miARN et Ago2 avec les siARN et ainsi les complexes effecteurs des miARN et des siARN sont distincts (Okamura et al. 2004). Chez les mammifères où il existe quatre protéines de la sous-famille Ago, Ago2 est la plus étudiée et est impliquée dans les deux voies de régulation induites par les miARN ou les siARN (J. Liu et al. 2004; Meister et al. 2004). Ces dernières années, plusieurs études ont permis de connaître la structure de ces protéines et ont fourni des indications sur leurs fonctions.

a. Organisation fonctionnelle des protéines Ago

Les protéines Ago ont une masse moléculaire d'environ 100 kDa, elles sont composées de 4 domaines principaux (Fig. 7) : le domaine N-terminal, le domaine PAZ (**P**iwi-**A**rgonaute-**Z**wille), le domaine MID et le domaine PIWI (**P**-element **I**nduced **W**Impy testis) à l'extrémité C-terminale de la protéine (Cerutti et al. 2000; J. S. Parker et al. 2005; J.-J. Song & Joshua-Tor 2006; Yuan et al. 2005). Mis à part le domaine N-terminal, chaque domaine est directement impliqué dans le silencing par les protéines Ago.

Toutes les protéines Ago peuvent interagir avec des petits ARN (siARN ou miARN), cette propriété est assurée par leurs domaine PAZ et MID. Le domaine PAZ, qui est aussi présent dans les protéines Dicer, interagit avec une haute affinité avec les deux nucléotides libres en 3' des petits ARN produits par Dicer (Lingel et al. 2003; Ma et al. 2004; J.-J. Song et al. 2003; Yan et al. 2003) et les études cristallographiques fournissent une base structurale pour cette interaction (Lingel et al. 2004; Ma et al. 2004). Cette interaction ne dépend pas de la séquence et est préservée si l'on remplace les ribonucléotides par des deoxyribonucléotides. Les duplex ARN qui n'ont pas les deux nucléotides 3' non hybridés ne sont pas ou peu pris en charge par le domaine PAZ (Ma et al. 2004; J.-J. Song et al. 2003).

Le domaine MID se situe entre le domaine PAZ et le domaine PIWI (Fig. 7), il contient une région très conservée qui forme une poche basique, cette poche permet l'intégration dans ce domaine du groupement phosphate à l'extrémité 5' d'un petit ARN (Frank et al. 2010; Ma et al. 2005; J. S. Parker et al. 2005; Y. Wang, Sheng, et al. 2008b; Y. Wang, Juranek, et al. 2008a; Y. Wang et al. 2009b). D'après Parker et Barford, l'ancrage de l'extrémité 5' d'un petit ARN dans cette poche dépend d'un ion métallique qui relie le phosphate 5' et la chaîne polypeptidique (J. S. Parker & Barford 2006). Il a été observé que la stabilité d'appariement des nucléotides aux extrémités 5' d'un petit ARN (siARN ou miARN) est un facteur déterminant pour le choix de l'orientation lors de l'intégration dans la protéine Ago (Khvorova et al. 2003; Schwarz et al. 2003). Czech et Hannon suggèrent que cette sélection du brin est la conséquence de la propriété de l'interaction MID/ARN, le phosphate 5' s'incorpore plus facilement dans la poche d'ancrage si la liaison Watson-Crick entre le nucléotide 5' et celui en face est moins forte (Czech & Hannon 2011). De plus, chez différentes espèces on observe une forte préférence pour une adénine ou un uracile comme nucléotide 5' du brin guide des miARN, ce qui est en accord avec la nécessité d'un nucléotide qui peut plus facilement se désengager de sa liaison Watson-Crick pour que le brin soit choisi en tant que brin guide (Czech et al. 2008; Czech et al. 2009; Frank et al. 2010; Ghildiyal et al. 2008; Ghildiyal et al. 2010; Hu et al. 2009; Lau et al. 2001; Mi et al. 2008).

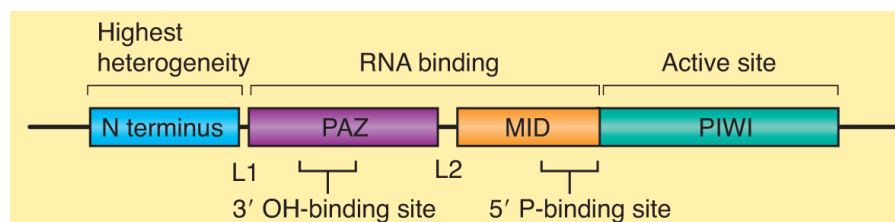


Figure 7, Organisation fonctionnelle des protéines Ago (Ender & Meister 2010). Les protéines Ago contiennent 4 domaines principaux. Le domaine N-terminal (bleu) est le domaine le plus variable parmi les différents membres de la famille, sa fonctionnalité reste à déterminer. Le domaine PAZ (violet) interagit avec les 2 nucléotides 3' non hybridés d'un petit ARN. Le domaine MID (orange) contient une poche basique très conservée qui permet la pénétration du 5' phosphate d'un petit ARN dans la protéine Ago. En coopération avec le domaine PAZ, il fixe un brin de petit ARN au sein de la protéine. Le domaine PIWI (vert) est situé à la partie C-terminale de la protéine, il héberge le site endonucléolytique (chez les Ago trancheuses uniquement), il contient également les motifs responsables au recrutement des protéines GW182 qui sont indispensables pour la régulation par les miARN.

Le domaine PIWI couvre la partie C-terminale des protéines Ago (Fig. 7) et ce domaine leur apporte deux fonctions cruciales : l'activité endonucléolytique et la capacité de recruter les cofacteurs (Czech & Hannon 2011; Lian et al. 2009; Schirle & MacRae 2012), en particulier les protéines de la famille GW182, qui vont être discutées plus en détail dans le chapitre *miARN et régulation par les miARN* (voir page 48).

Certaines protéines Ago, comme Ago2 des mammifères, Ago2 de la drosophile, etc., sont capables de couper le brin d'ARN en face du brin guide de petit ARN qu'elle prend en charge à condition que les deux brins soient parfaitement hybridés, ces protéines Ago ayant une activité endonucléolytique détectable sont appelées « Slicer » (« trancheuses ») (J. S. Parker & Barford 2006; Peters & Meister 2007; Tolia & Joshua-Tor 2007). Les brins d'ARN découpés par les protéines Ago « trancheuses » portent un hydroxyl en 3' et un phosphate en 5' comme les produits générés par les RNases H (Martinez & Tuschl 2004; Schwarz et al. 2004; Tolia & Joshua-Tor 2007). En effet, les études structurales des protéines Ago confirment que le domaine PIWI se replie en une structure voisine de celle des RNases H (J. S. Parker et al. 2004; J.-J. Song et al. 2004; Yuan et al. 2005). Le site catalytique Asp-Asp-His situé dans ce domaine est proche de celui d'une RNase H (J. S. Parker & Barford 2006; Peters & Meister 2007; Tolia & Joshua-Tor 2007). Les mutations sur ce motif perturbent l'activité endonucléolytique des Ago « trancheuses » (J. Liu et al. 2004). Il faut souligner que la séquence du motif catalytique varie parmi les protéines Ago et que d'autres éléments sont nécessaires pour assurer une activité endonucléolytique (Tolia & Joshua-Tor 2007). Par exemple, chez l'homme Ago2 et Ago3 possèdent le motif Asp-Asp-His, Ago2 est un « Slicer » mais Ago3 ne présente aucune activité endonucléolytique détectable (Tolia & Joshua-Tor 2007). L'activité endonucléolytique des protéines Ago est essentielle pour l'interférence par l'ARN, elle est également indispensable pour la biogenèse et l'incorporation (dans la protéine Ago « trancheuse ») d'un miARN particulier miR-451 (Cheloufi et al. 2010; Cifuentes et al. 2010). En plus de cette activité le domaine PIWI est aussi responsable au recrutement des protéines GW182, un élément central pour l'établissement de la régulation par les miARN.

b. Localisation des protéines Ago

Les protéines Ago sont exprimées d'une manière ubiquitaire dans l'organisme, les études par immunofluorescence indiquent que ces protéines sont généralement enrichies dans des foyers cytoplasmiques (Peters & Meister 2007). Cependant les protéines Ago sont aussi présentes de manière diffuse dans le cytoplasme. Enfin, les protéines Ago sont détectables dans le noyau (Peters & Meister 2007; Tolia & Joshua-Tor 2007) en accord des fonctions nucléaires comme le silencing transcriptionnel.

L'observation de l'accumulation des protéines Ago dans des foyers cytoplasmiques est intervenue après l'identification des structures regroupant des enzymes impliquées dans le métabolisme des ARNm. Les P-bodies, initialement décrits chez la levure *S. cerevisiae* sont souvent considérés comme les prototypes de ces foyers (Eulalio, Behm-Ansmant, et al. 2007a). En bref, les P-bodies sont riches en enzymes et cofacteurs impliqués dans la dégradation des ARNm (nucléase XRN1, facteurs de décoiffage DCP1 et DCP2, ...) ce qui suggère qu'ils pourraient être le lieu de la dégradation des ARNm (Peters & Meister 2007). Les études de co-localisation entre les marqueurs classiques des P-bodies et les protéines Ago ont montré que celles-ci s'y accumulaient aussi (J. Liu, Valencia-Sanchez, et al. 2005b; Sen & Blau 2005). Il est possible que cette localisation nécessite les protéines de la famille GW182 (Lian et al. 2009). La question de savoir s'il existe une seule classe de P-bodies ou plusieurs, qui pourraient différer par leur composition, est toujours ouverte. Le simple fait que les P-bodies ont été initialement décrits chez une levure qui est dépourvue de toute machinerie d'interférence par l'ARN, suggère que leur rôle dans la dégradation des ARNm est plus général que leur participation à la régulation par les petits ARN. Néanmoins, la présence des protéines Ago dans les P-bodies fournit un cadre simple dans lequel on peut placer l'interférence par l'ARN. Au-delà de la coupure endonucléolytique, le fait d'amener les ARNm associés aux complexes RISC dans les P-bodies pourrait rendre plus efficace leur dégradation (Peters & Meister 2007), ceci est encore plus pertinent pour l'activité des miARN qui implique une déadénylation des ARNm cibles. Effectivement, la déplétion de composants clés des P-bodies (GW182, DCP1/2 etc.) diminue l'efficacité des régulations conduites par les protéines Ago (Jakymiw et al. 2005; J. Liu, Rivas, et al. 2005a; Meister et al. 2005; Rehwinkel et al. 2005). Cependant, dans des conditions où il n'y a pas de P-bodies visibles dans les cellules (en microscopie optique), l'efficacité du silencing par les petits ARN n'est pas affectée. Une des interprétations possibles de ce

résultat est que les P-bodies représentent une forme d'agrégation de complexes moléculaires plus petits qui regrouperaient les différentes activités nécessaires à la dégradation des ARNm mais ne seraient pas détectables en microscopie optique.

Les P-bodies ne sont pas les seuls sites cytoplasmiques où les protéines Ago s'accumulent, elles sont aussi retrouvées dans les granules de stress ou sous forme diffuse dans le cytoplasme (Leung et al. 2006). Les granules de stress apparaissent dans le cytoplasme en réponse à différents types de stress (Buchan & R. Parker 2009). Par des approches appliquant la microscopie fluorescente, l'équipe de Sczakiel démontre que hAgo2 se déplace des P-bodies aux granules de stress, et que ce changement de localisation est associé à une diminution significative de la régulation par les petits ARN (Detzer et al. 2011). Cette inhibition de la régulation est réversible si le stress disparaît, ce qui suggère qu'Ago2 n'est pas capable de participer à la régulation par les petits ARN quand elle est retenue dans les granules de stress (Detzer et al. 2011).

De plus en plus de données montrent une implication des petits ARN dans les régulations transcriptionnelles qui se produisent dans le noyau (Gagnon & Corey 2012; Peters & Meister 2007; Janowski et al. 2006; Kim et al. 2006; Morris et al. 2004; Robb et al. 2005). Les protéines Ago sont aussi impliquées dans ces activités nucléaires des petits ARN dans le noyau (Peters & Meister 2007). En l'absence d'une accumulation dans des structures nucléaires facilement identifiables, la présence des protéines Ago a été confirmée par des expériences de fractionnement cellulaire (Meister et al. 2004; Robb et al. 2005).

B. Assemblage du complexe siRISC

Les siARN ne présentent d'activité biologique qu'après leur incorporation dans des complexes siRISC. L'association avec une protéine Ago compétente pour la coupure endonucléolytique est suffisante pour générer une activité endonucléase spécifique de séquence et constitue donc un siRISC fonctionnel minimal (Rivas et al. 2005). Les complexes siRISC contiennent d'autres protéines qui peuvent participer soit à la mise en place de l'interférence, soit à sa régulation. L'assemblage du complexe siRISC est une étape cruciale de l'interférence par l'ARN. Ce processus comprend deux étapes majeures : le chargement des petits ARN double-brin dans le complexe RISC et la dissociation du duplex brin guide/brin passager dans le complexe (Kawamata & Tomari 2010).

Dans des cellules humaines, ou dans des extraits cellulaires, des petits ARN simple-brin sont capables de s'incorporer dans les protéines Ago d'une manière ATP-indépendante (Martinez et al. 2002; Miyoshi et al. 2005; Rivas et al. 2005), par contre le chargement des siARN double-brin dans les protéines Ago requiert un complexe de chargement de RISC (RLC, RISC Loading Complex) qui consomme de l'ATP (J. Liu et al. 2004; Yoda et al. 2010). Peu de données sont disponibles concernant les détails de ce complexe RLC sauf dans le cas particulier du chargement d'Ago2 de *Drosophila* où la protéine Dicer (Dcr-2) est un facteur indispensable pour le chargement et pour la détection de la polarité du duplex siARN qui définit le choix du brin guide (Q. Liu et al. 2003; Pham et al. 2004; Tomari, Matranga, et al. 2004b; Tomari, Du, et al. 2004a). Chez les autres organismes, la protéine Dicer participe aussi au chargement des protéines Ago (Gregory et al. 2005; MacRae et al. 2008; Maniataki & Mourelatos 2005), mais l'interférence par l'ARN est maintenue en absence de Dicer (Kanellopoulou et al. 2005; Martinez et al. 2002; Murchison et al. 2005), suggérant que Dicer n'est pas un composant essentiel du RLC chez les mammifères. Pendant le chargement des protéines Ago, certains organismes établissent un tri des petits ARN en fonction de différents critères, par exemple chez les plantes, les petits ARN sont chargés dans différentes protéines Ago en fonction du nucléotide présent à l'extrémité 5' (Mi et al. 2008; Montgomery et al. 2008; Takeda et al. 2008) tandis que chez la *Drosophila*, les duplex petits ARN sont triés dans différentes protéines Ago selon le niveau de complémentarité entre les 2 brins (Förstemann et al. 2007; Okamura et al. 2004; Tomari et al. 2007). Par contre, chez les mammifères il ne semble pas qu'il y ait une spécificité d'association entre les petits ARN et les différentes protéines Ago (Kawamata & Tomari 2010). Toutefois, dans le cas des miARN, que ce soit chez la *drosophile* ou chez les mammifères, la présence d'une uridine à l'extrémité 5' est fréquemment observée et favorise le choix du brin guide (Seitz et al. 2011).

INTRODUCTION

siARN et interférence par l'ARN

Complexe RISC : Assemblage du complexe

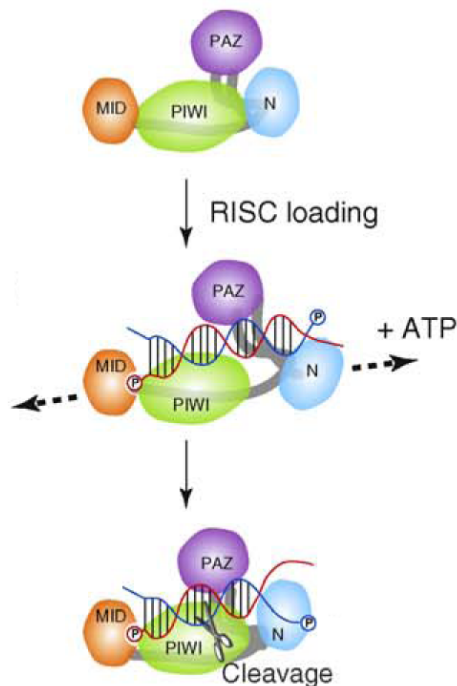


Figure 8, Chargement du siARN double-brin dans le complexe siRISC (Kawamata & Tomari 2010). Les 4 domaines de la protéine Ago sont représentés. Le chargement du siARN double-brin dans la protéine Ago est initié par une ouverture de la conformation d'Ago qui nécessite la consommation de l'ATP et probablement l'assistance du complexe RLC (RISC Loading Complex). Cette ouverture permet l'insertion du siARN double-brin dans la protéine Ago commencée par la pénétration de l'extrémité 5' du brin guide (brin rouge), dont la stabilité d'appariement est plus faible, dans la poche basique du domaine MID (orange). L'hybridation parfaite entre les deux brins du siARN ainsi incorporé va permettre l'élimination du brin passager (brin bleu) via une coupure effectuée par le domaine PIWI (vert).

Les études menées en cellules du mammifère ou de la Drosophile (Kawamata et al. 2009; Nykänen et al. 2001; Yoda et al. 2010) indiquent que les petits ARN sont chargés dans les protéines Ago sous forme double-brin et d'une manière ATP-dépendante. Les extrémités 5' phosphorylées et les nucléotides à l'extrémité 3' non hybridés du siARN (ou miARN) favorisent cette intégration en interagissant respectivement avec les domaines MID et PAZ de la protéine Ago (Lingel et al. 2003; Ma et al. 2004; Ma et al. 2005; J. S. Parker et al. 2005; J.-J. Song et al. 2003). Puisque les protéines Ago ne possèdent pas de région qui interagisse avec ATP, c'est probablement leur changement de conformation qui nécessite de l'énergie peut-être via le RLC. Ce changement conformationnel permet d'ouvrir le sillon dans lequel vient se loger l'ARN double-brin et le rend accessible. Une illustration schématique est présentée dans la Figure 8 (Kawamata & Tomari 2010). Cette hypothèse a été formulée au départ sur la base des études cristallographiques des protéines Ago de bactéries et d'archaeobactéries qui indiquent que les petits ARN double-brin d'environ 21 nucléotides sont trop volumineux pour s'intégrer dans une protéine Ago sans que sa conformation soit modifiée (Ma et al. 2005; J.-J. Song et al. 2004). Après le chargement d'un duplex de petit ARN et l'élimination du brin passager, la protéine Ago reste dans une configuration de type ouvert et l'entrée de l'ARN cible pour interagir avec le petit ARN guide ne nécessite pas d'ATP (Kawamata & Tomari 2010). Ce schéma a récemment été

INTRODUCTION

siARN et interférence par l'ARN

Complexe RISC : Assemblage du complexe

étendu à la protéine Ago2 humaine grâce à sa cristallisation en présence d'un petit ARN (Elkayam et al. 2012; Schirle & MacRae 2012)

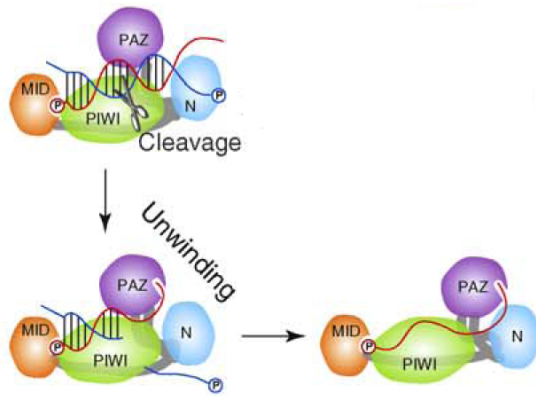


Figure 9, Activation du complexe siRISC (Kawamata & Tomari 2010). Les 4 domaines de protéine la Ago sont représentés. Le duplex siARN incorporé dans la protéine Ago trancheuse (Ago2 chez les mammifères par exemple) est parfaitement hybridé, la conformation du duplex et le positionnement du brin passager (brin bleu) sont optimaux pour que la protéine Ago puisse le couper par le site endonucléolytique hébergé dans son domaine PIWI (vert). Le brin passager (brin bleu) ainsi découpé est libéré de la protéine, le brin guide (brin rouge) y est fixé par le domaine MID (orange) et le domaine PAZ (violet). Le siRISC ainsi activé est prêt à accueillir l'ARNm ciblé par le brin guide.

Le complexe siRISC contenant un siARN double-brin est appelé pré-siRISC, il est inactif pour l'interférence par l'ARN car la présence du brin passager dans la protéine Ago ne permet pas d'interaction avec l'ARN cible. La dissociation du duplex siARN et l'élimination du brin passager de la protéine Ago sont nécessaires pour l'activation de siRISC (Fig. 9). La dissociation des duplex siARN (parfaitement complémentaires entre les deux brins) dépend probablement d'une coupure du brin passager qui, en principe, ne devrait être possible que si la protéine Ago possède une activité endonucléolytique détectable. Des résultats obtenus chez la Drosophile et chez l'homme établissent que les brins passagers sont coupés dans leur région centrale par Ago2 et que cette coupure ressemble à celle que subit un ARN cible (Leuschner et al. 2006; Miyoshi et al. 2005; Rand et al. 2005). Plus récemment, l'équipe de Novina a proposé que le mécanisme de la coupure du brin passager et celui de la coupure de l'ARN cible soient néanmoins différents car ils ont observé la coupure du brin passager par une protéine Ago1 recombinante exprimée chez les bactéries dont l'activité endonucléolytique n'a jamais été observée sur un ARN cible (B. Wang et al. 2009a). Ces observations suggèrent que la dissociation du duplex siARN n'obéit peut-être pas à un schéma aussi simple qu'initialement proposé et pourrait impliquer d'autres facteurs que les protéines Ago. Ensuite, le brin passager d'un siARN doit être éliminé de la protéine Ago afin de rendre accessible la région accueillant

l'ARN cible. Comme les fragments du brin passager sont de petite taille, on peut envisager qu'ils se dissocient spontanément du brin guide (Peters & Meister 2007) et que cette étape ne nécessite pas d'ATP (Haley & Zamore 2004; Kawamata et al. 2009; Yoda et al. 2010). Néanmoins, la dégradation des fragments du brin passager pourrait impliquer des endonucléases spécifiques (Y. Liu et al. 2009; Maiti et al. 2007). Le complexe C3PO (Component 3 of Promoter of RISC) a d'abord été identifié chez la drosophile comme un activateur de la formation de RISC. C3PO est un octamère qui comprend six molécules de Translin et deux de Trax, lesquelles ont une activité endonucléase simple brin (RNase >> DNase) ou exonucléase sur un duplex avec une coupure sur l'un des 2 brins (Tian et al. 2011; Ye et al. 2011). C3PO rend possible la formation des complexes actifs entre hAgo2 et un siARN présenté sous forme de duplex et l'inactivation de C3PO diminue fortement l'interférence par l'ARN dans des cellules mammifère (Ye et al. 2011). Ainsi, le schéma proposé actuellement est que la coupure du brin passager par l'activité endonucléolytique de hAgo2 rend le brin passager accessible à l'activité nucléase de C3PO. A priori, ce type de schéma n'est pas applicable aux duplex miARN car les mésappariements entre leurs 2 brins ne permettent pas la coupure par les protéines Ago, ce qui permet le recrutement de C3PO (Kawamata & Tomari 2010); l'assemblage du miRISC sera discuté dans le chapitre *miARN et régulation par les miARN*.

Il a aussi été proposé que la dissociation du duplex siARN ait lieu avant qu'il ne soit complètement incorporé dans les protéines Ago, une hélicase intervenant au cours de l'assemblage de RISC pourrait séparer les deux brins et laisser seul le brin guide s'intégrer dans les protéines Ago. Bien qu'il y ait de nombreuses hélicases candidates pour réaliser cette étape, il n'y a encore aucune preuve directe de l'existence de ce mécanisme. Si ces deux modèles diffèrent par le timing et le mécanisme de la dissociation des brins, ils sont en accord sur une sélection non aléatoire du brin guide. Les données expérimentales indiquent que, durant le choix du brin guide, la stabilité d'appariement des 2 nucléotides aux extrémités 5' joue un rôle déterminant (Khvorova et al. 2003; Schwarz et al. 2003), une dissociation plus facile favorise l'ancrage du 5' phosphate du brin guide dans la protéine Ago. Toutefois, il semble que dans les cellules en culture, le processus de sélection ne soit pas toujours aussi clairement défini (Wei et al. 2009).

III. Reconnaissance et dégradation de l'ARN cible

Une fois que le complexe siRISC est activé par l'élimination du brin passager du duplex siARN, le brin guide peut s'hybrider sur les molécules d'ARNm qui portent une séquence complémentaire via des interactions de type Watson-Crick. Cette hybridation spécifique de séquence localise le complexe siRISC sur la molécule d'ARNm. Lorsque la complémentarité entre le brin guide et sa cible est parfaite, la conformation et le positionnement du duplex siARN/ARNm cible à l'intérieur du complexe siRISC positionne l'ARNm dans le site catalytique des protéines Ago « trancheuses », permettant sa coupure. L'ARNm cible ainsi coupé est ensuite libéré du complexe et les ARN longs non protégés sont dégradés rapidement par les RNases présentes dans le cytoplasme. La diminution de la quantité de l'ARNm du gène cible conduit à une inhibition de l'expression du gène correspondant.

A priori, la reconnaissance de la séquence cible sur un ARNm pourrait se faire de deux manières (Rana 2007) : dans le premier mécanisme, le complexe RISC parcourt les molécules d'ARNm en cherchant la séquence complémentaire (un mécanisme de balayage, « scanning ») ; dans le deuxième mécanisme, RISC interagit aléatoirement avec des molécules d'ARNm jusqu'à ce qu'il trouve sa cible complémentaire et établisse une interaction stable entre eux. Un blocage physique de part et d'autre de la séquence cible d'un siARN par des oligonucléotides modifiés (2'-O-méthyl) ne diminue pas l'efficacité de la coupure induite par siRISC (Brown et al. 2005). Au contraire, ces modifications qui améliorent l'accessibilité de la séquence cible pour les siRISC en bloquant les ribosomes augmentent leur efficacité de coupure (Brown et al. 2005). Ces observations sont en faveur du deuxième modèle, les complexes RISC reconnaissant leur cible d'une manière séquence spécifique via des rencontres aléatoires entre le brin guide et les ARNm.

Comme l'élimination du brin passager, la reconnaissance de l'ARNm cible dans le complexe RISC est un processus ATP-indépendant (Haley & Zamore 2004; Kawamata et al. 2009; Yoda et al. 2010). Ceci est en accord avec le maintien de la protéine Ago dans une conformation ouverte après le chargement du duplex de petit ARN (Elkayam et al. 2012; Kawamata & Tomari 2010; Schirle & MacRae 2012). Les contributions de la partie 5' et de la partie 3' d'un brin guide au cours de la reconnaissance ne sont pas équivalentes. Les nucléotides situés de la 2^{ème} à la 8^{ème} (ou 7^{ème}) position à partir de l'extrémité 5' du

brin guide (cette région du brin guide est appelée la région d'amorçage) initient l'interaction avec la cible (Birmingham et al. 2006; Haley & Zamore 2004; A. L. Jackson et al. 2006; Ma et al. 2005; J. S. Parker et al. 2005). L'hybridation dans la région d'amorçage avec la cible permet un positionnement qui favorise son extension vers l'extrémité 3' du brin guide. Ainsi, les nucléotides de la région d'amorçage du brin guide jouent un rôle plus important que les autres nucléotides pendant la reconnaissance des cibles, l'hybridation de la région d'amorçage du brin guide sur la cible permet la nucléation d'une hybridation sur l'ensemble de la séquence. La taille de la région d'amorçage correspond à 2/3 d'un tour d'hélice et cette région est présentée dans une conformation pré-disposée en hélice. Ainsi cette première étape d'hybridation ne nécessite pas de réorganisation du complexe Ago/petit ARN, contrairement à la deuxième étape qui ne peut avoir lieu sans que soit libérée une des extrémités du petit ARN, ce qui a lieu grâce à un changement de la conformation de la protéine Ago (Ma et al. 2005; J. S. Parker et al. 2005; Yuan et al. 2005). Il en résulte la formation d'une hélice ARN double-brin de forme A (Ma et al. 2005; J. S. Parker et al. 2005). L'ensemble de ces réarrangements place les nucléotides en face du 10^{ème} et 11^{ème} nucléotide (à partir de l'extrémité 5') du brin guide en proximité du site catalytique de la protéine Ago. La coupure de la cible a lieu entre ces 2 nucléotides (Haley & Zamore 2004; Hutvagner & Zamore 2002). Une fois coupé et libéré dans le cytoplasme, l'ARNm est digéré rapidement par les exonucléases 5' et 3' (XRN1 et l'exosome) et l'ensemble de la machinerie cellulaire chargée de la dégradation des ARNm. La localisation des complexes RISC dans les P-bodies pourrait faciliter l'élimination des ARNm après leur coupure. Cependant il n'existe pas de démonstration que les P-bodies jouent un rôle dans l'interférence par l'ARN, celle-ci étant toujours fonctionnelle dans des conditions où il n'y a pas de P-bodies détectables dans la cellule.

Le siRISC est un complexe enzymatique recyclable, un siRISC peut couper plusieurs molécules d'ARNm cible (Haley & Zamore 2004; Hutvagner & Zamore 2002). Les expériences effectuées dans les lysats cellulaires de la *Drosophila* suggèrent que le recyclage des siRISC est dépendant de l'ATP car la présence de l'ATP renforce ce phénomène (Haley & Zamore 2004). D'après les résultats de cette équipe, l'ATP est probablement impliqué dans la libération des fragments de l'ARNm généré par la coupure (Haley et al. 2003). Les études mises en œuvre avec le siRISC minimal, contenant seulement la protéine hAgo2 recombinante et le siARN (Rivas et al. 2005), suggèrent que la libération du produit découpé nécessite l'intervention des facteurs autres que la protéine

Ago. En effet, le siRISC minimal est capable de couper les ARNm cibles mais les fragments de l'ARNm cible restent associés au complexe et son recyclage est très fortement ralenti. Le brin guide est retenu dans le siRISC au cours de la dissociation de la cible coupée.

Les expérimentateurs choisissent souvent la séquence cible d'un siARN dans la région codante d'un ARNm. Une caractéristique de la région codante est qu'elle contient peu de structures secondaires fortes, ce qui permet aux siRISC d'accéder à leur séquence cible sans avoir à résoudre des structures de l'ARN. A l'inverse, la présence des structures secondaires impliquant la séquence cible diminue radicalement l'inhibition de l'expression du gène ciblé (Brown et al. 2005; Overhoff et al. 2005; Schubert et al. 2005).

Bilan

Les petits ARN interférant (siARN) sont les effecteurs du silencing induit par les ARN double-brin dans les cellules somatiques. La génération des siARN à partir d'ARN double-brin longs dépend de Dicer, une enzyme de la famille de RNase III. Le silencing est effectué par le complexe siRISC qui associe le siARN avec des protéines. Une protéine de la famille Ago est au cœur de ce complexe et interagit directement avec le siARN. Certaines des protéines Ago possèdent une activité endonucléolytique et dans ce cas on observe la présence dans les cellules d'une activité endonucléolytique spécifique de séquence. Pour que le complexe soit actif il faut que le brin « passager » du siARN soit éliminé afin de permettre l'interaction entre le brin guide et l'ARN cible. Les ARNm cibles sont coupés par les protéines Ago ayant une activité endonucléolytique d'une manière catalytique, le complexe étant de nouveau disponible après l'élimination des fragments d'ARN générés. Si le complexe minimal associant une protéine Ago et un siARN est biochimiquement actif, l'efficacité de l'interférence par l'ARN induite par un tel complexe est restreinte (Rivas et al. 2005), suggérant l'intervention d'autres facteurs. La purification des complexes RISC a permis d'établir une longue liste de protéines (Landthaler et al. 2008) qui pourraient contribuer à l'efficacité du silencing. Cependant, dans le cas d'une cible parfaite, il est probable que ce sont des éléments généraux de la dégradation des ARNm qui interviennent plutôt que ces constituants du complexe RISC qui sont, par contre, essentiels pour le silencing en mode miARN (mode imparfait).

Chapitre III. miARN et régulation par les miARN

Les microARN (miARN) constituent une autre catégorie de petit ARN régulateurs dont les mécanismes d'action partagent plusieurs éléments importants avec ceux des siARN. De fait, en particulier chez les mammifères, il n'existe pas de frontière stricte entre siARN et miARN. L'identité d'un miARN est définie par sa biogenèse : les miARN sont issus de régions structurées des ARN simple brin qui comprennent une « tige » qui ne dépasse pas une trentaine de nucléotides, alors que les siARN sont le plus souvent issus de l'appariement de deux molécules complémentaires ou, pour certains siARN endogènes, de la présence d'une grande région répétée et inversée sur un transcrit. Cependant, la dernière étape de la maturation des miARN, comme celle des siARN, est assurée par Dicer, et dans les deux cas les petits ARN matures double-brin sont transférés dans un complexe RISC. Un élément plus immédiatement perceptible de la différence entre miARN et siARN vient de l'interaction avec leurs cibles qui, chez les mammifères, est presque toujours via une complémentarité imparfaite pour les miARN. C'est donc souvent ce mode d'interaction « imparfaite » qui est utilisé pour définir les miARN chez les mammifères. Cependant, chez les plantes, les cibles sont parfaitement complémentaires. Dans certains cas particuliers chez les mammifères, un miARN peut induire la coupure d'un ARNm si la cible est parfaitement complémentaire (Yekta et al. 2004). Enfin, les siARN peuvent agir sur une cible imparfaite et induire une régulation en apparence indistinguishable de celle d'un miARN. Ce dernier point est d'ailleurs à l'origine des effets hors cibles spécifiques de séquence des siARN. Ainsi, chez les mammifères, le taux de complémentarité avec la séquence cible détermine le mode d'action d'un petit ARN tandis que sa biogenèse et sa classification comme siARN ou miARN ne semblent pas déterminantes.

Le mécanisme de la régulation par les miARN est moins bien caractérisé que celui des siARN, ce qui reflète probablement la complexité de cette régulation. L'origine d'une différence essentielle avec le cas des siARN sur une cible parfaite est facilement identifiable : comme la séquence cible n'est pas parfaitement complémentaire avec le miARN, en particulier dans la région centrale, une coupure endonucléolytique de l'ARNm est soit impossible soit au mieux très inefficace. En conséquence, la régulation met en cause d'autres mécanismes qui peuvent soit diminuer l'efficacité de la traduction soit déstabiliser les transcrits (via une déadénylation). Même si les protéines Ago pourraient

INTRODUCTION

miARN et régulation par les miARN

intervenir directement dans ces mécanismes, il semble surtout que les partenaires présents au sein du complexe miRISC soient responsables de ces activités.

I. Biogenèse des miARN et assemblage des miRISC

Les miARN sont produits par des gènes cellulaires, les miARN primaires (pri-miARN) étant des transcrits qui contiennent une tige-boucle (qui va générer le miARN précurseur ou pré-miARN). A la fin de la maturation, le miARN mature est un ARN presque complètement double-brin d'environ 21 nucléotides. Leur biogenèse est assurée en deux étapes principales par deux enzymes de la famille de RNase III : Drosha et Dicer. Comme les siARN, les miARN sont incorporés dans un complexe RISC assemblé autour d'une protéine Ago. En fonction des espèces, cette voie de maturation peut-être distincte de celle des siARN avec des enzymes et des protéines Ago spécifiques comme chez la Drosophile ou bien, comme dans le cas chez les mammifères, être presque indiscernable de celle-ci.

A. Gènes de miARN et leur transcription

Les miARN sont issus de transcrits cellulaires qui sont très majoritairement des produits de la polymérase II (Bartel 2004; Cai et al. 2004; Filipowicz et al. 2008; Y. Lee et al. 2004a). Toutefois, des miARN dont l'expression est contrôlée par un promoteur dépendant de la polymérase III sont fonctionnels *in vivo* (C.-Z. Chen et al. 2004) et des exemples de miARN synthétisés par Pol III ont été décrits chez l'homme (Borchert et al. 2006). Les précurseurs de miARN peuvent être inclus dans des gènes non codants ou dans des gènes déjà identifiés comme des ARNm classiques. Dans ce cas, qui représente environ la moitié de miARN décrits (Saini et al. 2007), ils sont souvent situés à l'intérieur d'un intron. De ce fait, ces miARN sont souvent appelés introniques même lorsqu'ils sont situés dans la région 3' non codante d'un ARNm. Indépendamment de l'organisation codante ou non codante du gène (Cai et al. 2004; Y. Lee et al. 2004a), leur transcription est sous le contrôle de facteurs de transcription (Lagos-Quintana et al. 2001; Lau et al. 2001; R. C. Lee & Ambros 2001; Bartel 2004). L'expression des miARN introniques est corrélée avec celle du gène hôte en accord avec le fait que le transcrit primaire sert de précurseur à la fois pour le miARN et pour l'ARNm. Leur expression est donc sous le contrôle des facteurs de transcription du gène hôte et des facteurs d'épissage (Aravin et al. 2003; Lagos-Quintana et al. 2003; Lai et al. 2003; Lim et al. 2003; Rodriguez et al. 2004). La maturation du miARN

peut cependant en partie découpler le niveau d'accumulation du miARN mature de celle de l'ARNm du gène hôte (Thomson et al. 2006), tandis que dans certains cas, des promoteurs internes pourraient permettre une transcription d'un précurseur spécifique du miARN, distincte de l'ARNm déjà connu (Monteys et al. 2010).

Une observation inattendue et dont la signification n'est toujours pas claire est que les gènes de miARN situés dans des transcrits non codants sont souvent groupés, plusieurs miARN différents étant générés à partir d'un seul transcrit initial. En d'autres termes, le transcrit primaire est « polycistronique » (Bartel 2004; Filipowicz et al. 2008; Y. Lee et al. 2002) et l'expression de ces différents miARN est en partie couplée, même si, de nouveau, la maturation peut introduire des différences d'expression. Environ 40 % des miARN seraient ainsi organisés en groupe (Altuvia et al. 2005). Un des exemples qui a été bien étudié est le transcrit primaire miR-17-92 dont la surexpression peut promouvoir la prolifération cellulaire (He et al. 2005). Il est tentant d'envisager que les différents miARN issus d'un même précurseur polycistronique régulent des gènes impliqués dans les mêmes fonctions mais les données sont très partielles et ne dégagent pas une image aussi simple de couplage fonctionnel. Dans le cas du transcrit primaire miR-17-92, seuls deux des six miARN (miR-19a et miR-19b, en fait des formes proches du même miARN) jouent un rôle important dans la tumorigenèse (Mu et al. 2009).

B. Maturation des miARN

La nature d'un miARN est entièrement définie par une organisation en tige-boucle présente sur le transcrit primaire, appelé aussi pri-miARN (Bartel 2004; Y. Lee et al. 2002; X. Liu et al. 2008). Contrairement aux structures tige-boucle donnant naissance aux siARN endogènes dont la partie double-brin est longue et parfaitement complémentaire, les structures tige-boucle de type miARN portent fréquemment plusieurs mésappariements dans leur tige. De plus, la longueur de cette région double-brin est restreinte et ne dépasse pas une trentaine de nucléotides. Les pri-miARN étant des transcrits Pol II sont beaucoup plus longs que la structure tige-boucle elle-même surtout si l'on tient compte des introns. Comme les ARN simple brin sont toujours repliés en structures complexes avec de nombreuses tige-boucles, la spécificité des pri-miARN vient de ce que les tige-boucles présentes ont des caractéristiques qui vont permettre leur prise en charge par la voie de maturation des miARN.

La maturation des miARN consiste en deux étapes principales qui sont assurées par deux RNase III différentes (Fig. 10A). La première étape a lieu dans le noyau et dépend de Drosha. Les tige-boucles d'un pri-miARN dont les caractéristiques satisfont aux critères de tige-boucle « type miARN » sont reconnues et coupées par un complexe appelé « microprocesseur » (X. Liu et al. 2008). Les composants clés de ce complexe sont Drosha (Y. Lee et al. 2003) et une protéine de liaison aux ARN double-brin nommée DGCR8 chez les mammifères et Pasha chez la Drosophile (Denli et al. 2004; Gregory et al. 2004; J. Han et al. 2004; Landthaler et al. 2004). La protéine DGCR8 interagit avec les jonctions ARN simple-brin/ARN double-brin à la base de la tige-boucle miARN. Les dimères DGCR8 interagissent avec les tige-boucles miARN, recrutent l'enzyme Drosha et d'autres facteurs du « microprocesseur » sur les pri-miARN et assurent la coupure de ces derniers pour libérer les pré-miARN (Faller et al. 2007). Drosha effectue la coupure des structures tige-boucle à la base de la tige, la position de cette coupure semble être déterminée par les positions des mésappariements à l'intérieur de la tige (J. Han et al. 2006). Comme toutes les enzymes de la famille RNase III, Drosha coupe ces tige-boucles miARN en laissant une extrémité double-brin bien caractérisée : une extrémité 5' phosphorylée sur un brin, une extrémité 3' avec 2 nucléotides non hybridés sur l'autre. Les tige-boucles ainsi libérées du pri-miARN comprennent environ 70 nucléotides, elles sont appelées précurseurs de miARN ou pré-miARN (R. C. Lee & Ambros 2001). Les caractéristiques de type RNase III de l'extrémité double-brin des pré-miARN sont indispensables pour la suite de leur maturation. Certaines petites molécules d'ARN peuvent se replier en structure tige-boucle et peuvent établir une extrémité double-brin possédant les mêmes propriétés que les pré-miARN. Dans ce cas, bien que ces molécules ne soient pas traitées par le « microprocesseur », elles entrent également dans la voie de maturation des miARN et sont transformées en miARN matures (Berezikov et al. 2007; Okamura et al. 2007; Ruby et al. 2007; J.-S. Yang & Lai 2011), la biogenèse de ces miARN est indépendante de Drosha (Fig. 10B). Le « microprocesseur » comprend d'autres facteurs, notamment des protéines de la liaison aux molécules d'ARN et certaines d'entre elles jouent un rôle important dans la maturation des miARN *in vivo* (Fukuda et al. 2007; Guil & Cáceres 2007) mais les détails restent à clarifier. Les pré-miARN générés dans le noyau sont pris en charge par un transporteur spécifique l'exportine 5 et des cofacteurs qui les stabilisent (Yi et al. 2003), ce qui permet leur transport du noyau au cytoplasme (Bohnsack et al. 2004; Lund et al. 2004; Yi et al. 2003).

INTRODUCTION

miARN et régulation par les miARN

miARN biogenèse : gènes et maturation des miARN

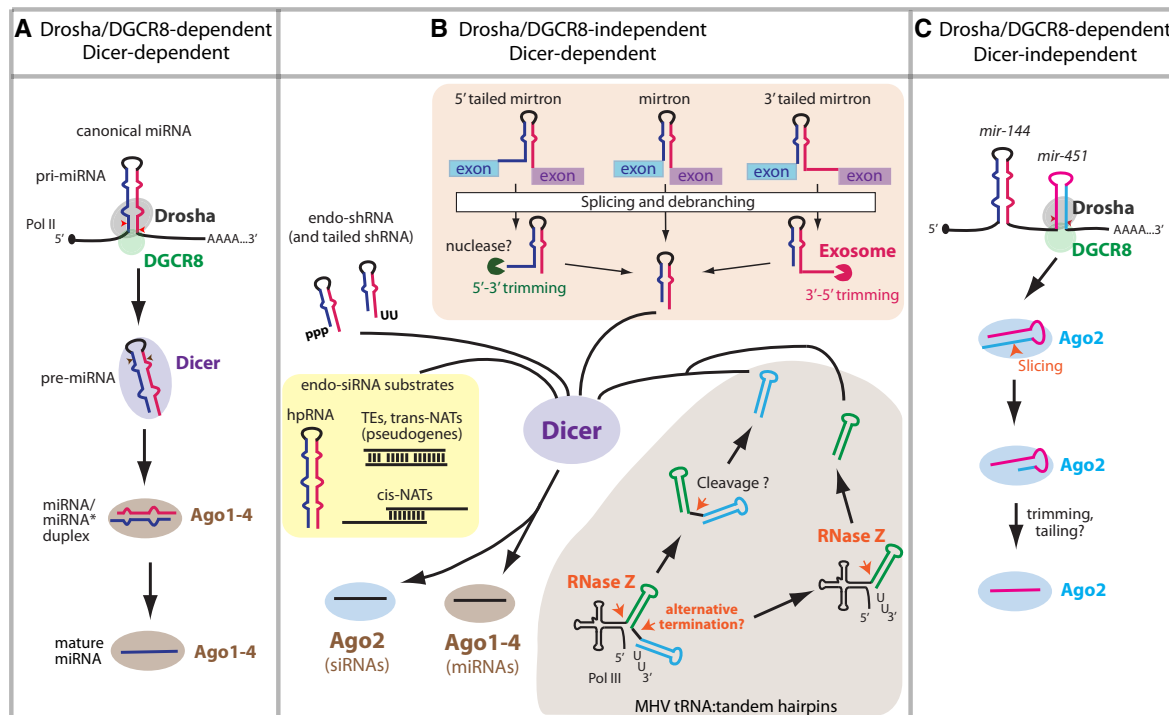


Figure 10, Les différentes voies de la biogenèse des miARN (J.-S. Yang & Lai 2011). **A) La voie classique de la biogenèse des miARN impliquant Drosha et Dicer.** Drosha libère les pré-miARN (précurseur de miARN) en structure tige-boucle en effectuant une coupure à la base des régions structurées présentes dans les pri-miARN (miARN primaire) en laissant des extrémités typiques des RNase III. Les pré-miARN sont ensuite pris en charge par Dicer afin d'enlever la boucle en laissant également des extrémités de type RNaseIII pour produire le duplex miARN/miARN*. Les duplex miARN/miARN* sont chargés dans les protéines Ago. **B) La voie de biogenèse indépendante de Drosha.** Des ARN de petite taille initialement formés dans le noyau (par exemple des produits d'épissage) et ayant une structure en tige-boucle peuvent être pris en charge par Dicer après leur export dans le cytoplasme dès lors que les extrémités sont de type RNase III. Les duplex matures après ce traitement par Dicer sont alors indistinguables des autres miARN et sont incorporés dans les protéines Ago. **C) La voie de biogenèse des miARN indépendante de Dicer.** Un cas particulier de la maturation des miARN est celui de miR-451. Le pré-miR-451 est libéré par Drosha de son pri-miARN, la longueur particulièrement courte de ce pré-miARN lui permet de s'incorporer directement dans les protéines Ago. S'il est pris en charge par une Ago « trancheuse » (Ago2), la partie en position de brin passager peut être coupée. Des cofacteurs d'Ago2 interviennent pour raccourcir la partie retenue dans Ago2 par l'extrémité 3' et finaliser l'incorporation du brin guide miR-451.

La deuxième étape de la maturation a lieu dans le cytoplasme. Les pré-miARN libérés de l'exportine 5 sont pris en charge par la protéine Dicer. Le domaine PAZ de Dicer interagit avec les deux nucléotides non hybridés à leur extrémité 3' et les coupe à environ 21 nucléotides générant le duplex miARN mature miARN/miARN* (miARN* désignant le brin passager). Les détails de la coupure effectuée par Dicer ont été discutés dans le chapitre *siARN et interférence par l'ARN*. Comme les deux extrémités du duplex miARN

ont été générées par des enzymes de la famille RNase III, elles sont identiques à celles d'un siARN double-brin : extrémité 5' phosphorylée et deux nucléotides non appariés en 3'. Cependant, à la différence des siARN, les 2 brins du duplex miARN contiennent le plus souvent quelques mésappariements, notamment dans la région centrale du duplex, ce qui est susceptible de diminuer la stabilité du duplex (voir plus bas).

La maturation des structures en tige-boucle par Drosha puis Dicer est responsable de la genèse d'une grande majorité des miARN. Il existe cependant des voies alternes pouvant concerner l'une ou l'autre de deux étapes qui sont résumés dans la Figure 10 (J.-S. Yang & Lai 2011). Ainsi le produit de l'épissage d'un intron peut, après débranchement, générer une structure en tige-boucle qui se substitue au pré-miARN (Fig. 10B). Les « mirtrons » ont surtout été étudiés chez la Drosophile et *C. elegans*, mais il en existe quelques exemples chez les mammifères comme miR-877 et miR-1226 (Sibley et al. 2012). Par contre, d'autres candidats mirtron (miR-1225, miR-1228) suivent une voie différente qui utilise Drosha mais pas Dicer, les enzymes responsables de la maturation dans le cytoplasme n'ayant pas encore été caractérisées (Havens et al. 2012). Une autre voie, indépendante de Dicer, a été décrite et utilise l'activité endonucléolytique d'Ago2 dans le cas de miR-451 (Fig. 10C). Il faut noter que le pré-miR-451 est nettement plus petit qu'un pré-miARN classique et peut directement être inséré dans les protéines Ago (Cheloufi et al. 2010; Cifuentes et al. 2010; J.-S. Yang et al. 2010). Dans certains cas, les protéines Ago sont également impliquées dans la biogenèse des miARN. Ago2 humaine intervient dans le traitement des précurseurs miARN avant l'étape de Dicer pour affiner l'extrémité 5' de certains pré-miARN ou pour faciliter la séparation des brins après le traitement de Dicer (Diederichs & Haber 2007). Par ailleurs, durant le développement cérébral de souris, un grand nombre de miARN sont modifiés à leurs extrémité 3' après l'incorporation dans Ago2, cette modification change l'activité biologique de certains miARN (Juvvuna et al. 2012). Il existe donc une grande flexibilité dans la biogenèse des miARN, qui reflète la prise en charge des structures en tige-boucle par différentes enzymes cellulaires.

C. Assemblage du miRISC

Une fois le complexe RISC formé et le brin passager éliminé, il n'existe pas de moyen de distinguer entre les complexes RISC formés à partir d'un miARN ou d'un siARN, du

moins chez les mammifères. Dans les deux cas, le brin guide permet d'introduire une spécificité de séquence dans les interactions du complexe RISC. Selon le modèle proposé par Kawamata et Tomari (Kawamata & Tomari 2010), l'assemblage du complexe miRISC et du complexe siRISC est similaire dans plusieurs aspects : dans les deux cas c'est un ARN double brin qui est chargé dans la protéine Ago, l'orientation du duplex étant biaisée par le même critère de stabilité de l'extrémité 5'. La différence centrale entre l'assemblage de ces deux types de RISC est le mécanisme de l'élimination du brin passager : Alors que dans le cas d'un siARN le seul moyen efficace d'éliminer le brin passager est de le couper, pour les miARN il est proposé que la moindre stabilité du duplex due à la présence de mésappariements pourrait permettre une dissociation spontanée. Un schéma simplifié de l'assemblage du complexe miRISC par la dissociation spontanée est résumé dans la Figure 11 (Kawamata & Tomari 2010). L'existence d'une voie alternative d'élimination du brin passager a été initialement suggérée par l'observation que des modifications sur le brin passager d'un duplex siARN qui bloquent sa coupure n'inhibent pas complètement la dissociation du duplex (Matranga et al. 2005). Ce type de dissociation s'établit à une vitesse nettement réduite par rapport à celle conduite par la coupure du brin passager si les 2 brins sont parfaitement complémentaires (Matranga et al. 2005), mais la présence des mésappariements favorise ce processus (Matranga et al. 2005; Tomari et al. 2007). En particulier, les mésappariements positionnés dans la séquence d'amorçage (les nucléotides 2 à 8 à partir de l'extrémité 5') et la région 3' (les nucléotides 12 à 17) du brin guide (Kawamata et al. 2009; Yoda et al. 2010) accélèrent la libération du brin passager. Ce sont les deux régions qui contribuent à l'interaction miARN/ARNm cible (Fig. 12). Il est cependant peu probable que la seule dissociation spontanée puisse permettre un assemblage efficace des complexes miRISC puisque dans le cas d'un duplex siARN parfait et d'une Ago trancheuse, des partenaires interviennent pour faciliter l'élimination des deux fragments bien que ceux-ci aient une énergie d'interaction faible avec le brin guide. Cet aspect n'a pas encore été étudié en détail mais le rôle du domaine N-terminal de Ago2 dans l'activation du complexe RISC s'étend au cas des miARN (Kwak & Tomari 2012). Le modèle proposé est que le domaine N-terminal se positionne comme un coin entre les deux brins du duplex et pourrait ainsi dissocier les quatre premiers nucléotides du duplex.

INTRODUCTION

miARN et régulation par les miARN

Complexe miRISC : Assemblage du complexe

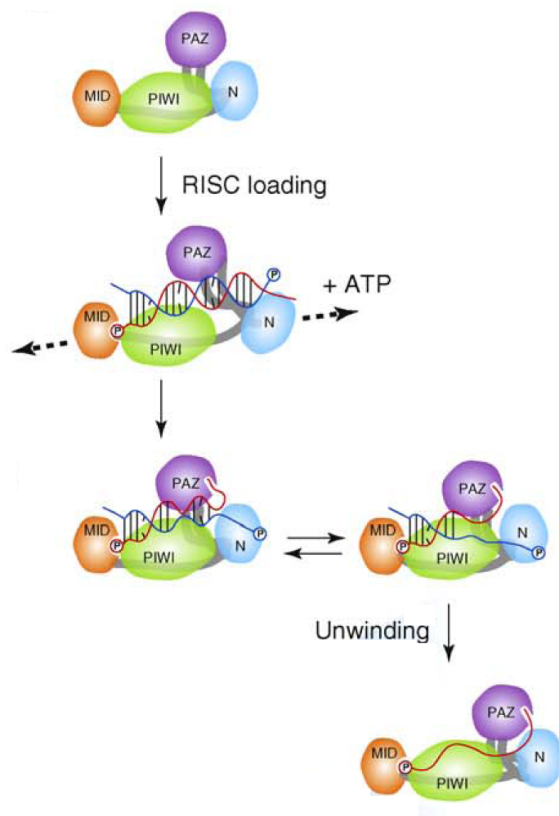


Figure 11, Assemblage et activation du complexe miRISC (Kawamata & Tomari 2010). Les 4 domaines de la protéine Ago sont indiqués. Pour pouvoir accueillir le duplex miARN, la protéine Ago doit d'abord être mise dans une configuration ouverte. Ce changement conformationnel consomme de l'ATP et inclut probablement l'intervention du complexe RLC (RISC Loading Complex). Le nucléotide à l'extrémité 5' du brin guide (brin rouge), dont la stabilité d'appariement est plus faible, s'intègre dans la poche basique située dans le domaine MID (orange). Les mésappariements entre les deux brins du duplex miARN/miARN* inhibent la coupure endonucléolytique du brin passager (brin bleu) mais favorisent la dissociation spontanée des brins dans la protéine Ago. Le brin passager est ainsi exclu de la protéine tandis que le brin guide y est retenu par l'interaction 5' avec le domaine MID et 3' avec le domaine PAZ (violet). Le miRISC est alors actif et le brin guide de miARN est prêt à interagir avec l'ARNm cible.

Puisque les protéines Ago dépourvues d'activité trancheuse (les Ago « émoussées », Ago1, 3, 4 chez les mammifères) peuvent éliminer avec une bonne efficacité le brin passager miARN*, toutes les protéines Ago sont potentiellement impliquées dans le silencing par les miARN. Bien qu'une analyse précise *in vivo* soit rendue compliquée par la présence de quatre protéines Ago, deux types de données confortent l'idée que les quatre protéines Ago sont capables d'induire le silencing par un miARN (sur une cible imparfaite). D'une part, l'ancrage sur un transcrit (via une interaction peptide/tige-boucle sur le transcrit, par exemple λ N/BoxB) de l'une des quatre protéines Ago est capable d'induire un silencing avec des caractéristiques reproduisant celles d'un silencing induit par les miARN (Pillai et al. 2004). D'autre part, dans des cellules souches embryonnaires de souris dans lesquelles les quatre gènes *Ago* ont été invalidés, la réintroduction de l'un d'entre eux est suffisante pour rétablir l'activité des miARN (Su et al. 2009).

La sélection du brin guide (miARN) et du brin passager (miARN*) respecte les mêmes critères que dans le cas de siARN, le brin dont le nucléotide à l'extrémité 5' a la stabilité

d'appariement la plus faible sera incorporé de préférence dans la position du brin guide. La position initiale des 2 brins au sein du pré-miARN (sur la branche 5' ou 3' de la tige) n'a pas d'impact sur la sélection du brin (Kawamata & Tomari 2010). Mais la force du biais de sélection est très variable en fonction des miARN considérés et dans certains cas l'abondance des complexes avec un brin guide miARN* est voisine de celles avec le brin miARN.

D. Reconnaissance de la cible

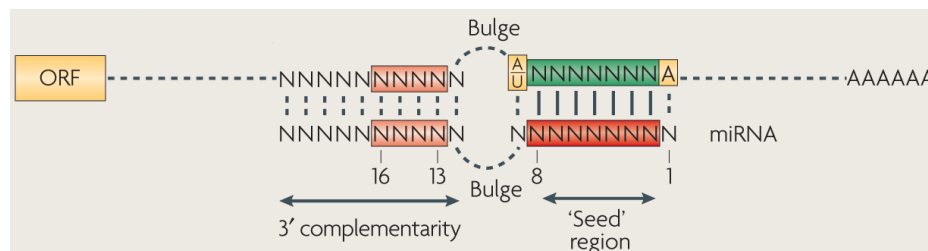


Figure 12, Interaction miARN/ARNm (Filipowicz et al. 2008). Contrairement à l'hybridation entre un siARN et l'ARNm cible qui est parfaitement complémentaire, dans le règne animal, l'hybride miARN/ARNm porte le plus souvent des mésappariements dans sa région centrale. Ce type d'hybridation est initié par l'interaction entre la séquence d'amorçage (2^{ème} à 8^{ème} nucléotide au départ du 5' de miARN, encadrée par le rectangle rouge) du miARN et les nucléotides d'ARNm situés en face (encadrés par le rectangle vert). La séquence d'amorçage de miARN est importante pour l'interaction séquence spécifique avec ses cibles. Dans la majorité des cas, les hybridations supplémentaires ont lieu entre la partie 3' de miARN et les nucléotides d'ARNm en face (encadrés par les rectangles roses) pour stabiliser l'interaction miARN/ARNm.

Au sein d'une protéine Ago, les propriétés d'un miARN simple brin sont identiques à celles d'un siARN simple brin et la reconnaissance de la cible par un miARN obéit donc au même principe de départ que dans le cas d'un siARN (pour plus de détails, voir Chapitre *siARN et interférence par l'ARN*). La région d'amorçage du brin guide initie l'interaction entre le miARN et sa cible (Birmingham et al. 2006; Doench & Sharp 2004; Haley & Zamore 2004; A. L. Jackson et al. 2006; Lewis et al. 2003) et de ce fait cette région détermine pour une grande part l'identification des cibles d'un miARN. La différence centrale entre le cas d'un siARN et d'un miARN vient de ce que dans la majorité des cas de cible naturelle de miARN (dans le règne animal), la région centrale du brin guide ne s'hybride pas avec l'ARNm cible (Fig. 12). En conséquence, ces mésappariements empêchent la coupure de l'ARNm par les protéines Ago possédant une activité endonucléolytique, et l'on peut supposer que la régulation par une Ago «trancheuse»

(Ago2) en mode miARN est la même que par les autres protéines Ago. La région 3' du brin guide constitue aussi un élément important pour l'interaction guide/cible (Brennecke et al. 2005; Grimson et al. 2007), l'hybridation dans cette région stabilise cette interaction et augmente considérablement la capacité d'un miARN à inhiber l'expression du gène cible (Broderick et al. 2011).

Le modèle de Kawamata sur la dissociation du duplex miARN/miARN* au sein de la protéine Ago établit une relation inverse entre l'élimination du brin passager et la reconnaissance de l'ARNm cible par le brin guide. Les facteurs qui favorisent la dissociation du duplex miARN sont ceux qui limitent la reconnaissance de cible par le miARN : les mésappariements dans la région d'amorçage et dans la région 3' du brin guide accélèrent la dissociation du duplex miARN/miARN* mais inhibent la reconnaissance de la cible ; les interactions entre les bases G et U favorisent la dissociation du duplex miARN/miARN* mais défavorisent la reconnaissance de la cible puisqu'elle sont moins stable thermodynamiquement (Doench & Sharp 2004; Grimson et al. 2007; Kawamata et al. 2009). Il est important de noter que les deux processus sont indépendant de l'ATP (Haley & Zamore 2004; Kawamata et al. 2009; Yoda et al. 2010) et dépendent donc fortement des considération thermodynamiques. La dissociation du duplex miARN est en pratique irréversible car les brins passagers libérés des protéines Ago sont rapidement dégradés par les nucléases (Kawamata & Tomari 2010). A l'inverse, l'importance de la dissociation du complexe miRISC de sa cible est difficile à apprécier. Tout au plus peut-on envisager que si l'interaction est trop instable elle ne pourra probablement pas conduire à un silencing efficace tandis que le principe des inhibiteurs de miARN est de fournir des petits ARN cibles portant des modifications (2'-O methylation ou LNA, « locked Nucleic Acid ») qui augmente l'énergie d'interaction avec le brin guide et ainsi forment des complexes stables dans la cellule. Une trop grande stabilité du complexe miRISC/cible modifiée non coupable, peut donc titrer les complexes miRISC qui existent dans la cellule (voir plus bas pour le nombre de complexes).

Ce modèle implique que la taille de la région complémentaire entre un petit ARN guide et sa cible a un impact important sur la reconnaissance de cible. Dans le cas d'un siARN où le brin guide et la séquence cible sont parfaitement complémentaires sur environ 18 nucléotides, l'énergie d'interaction est suffisante pour qu'elle soit stable dans la cellule tandis que la quantité d'information est suffisante pour que la cible puisse être unique dans

le génome. A l'inverse, pour les miARN, la séquence d'amorçage (environ 7 nucléotides, Fig. 12) est clairement insuffisante pour établir une interaction stable et par ailleurs un motif de 7 nucléotides est présent sur de nombreux transcrits (statistiquement tous les 16 kb de séquence). Deux classes de mécanismes contribuent à augmenter l'efficacité et la spécificité des interactions entre les miARN et leurs cibles. Tout d'abord, la présence d'autres nucléotides appariés dans la région 3' du brin guide augmente rapidement la spécificité et la stabilité de l'interaction. De fait, la majorité des cibles fonctionnelles de miARN présentent de 10 à 12 nucléotides susceptibles d'interagir avec le miARN. Un deuxième moyen d'augmenter la spécificité et l'énergie d'interaction est à travers les interactions entre le complexe RISC et la couverture protéique des ARNm. Si les premiers effets décrits ont porté sur une compétition entre la régulation par les miARN et la couverture protéique dans les cas de HuR et Dnd1 (Bhattacharyya et al. 2006; Kedde et al. 2007), d'autres travaux plus récents montrent que UPF1 et PTB peuvent aussi contribuer à la régulation par les miARN (Engels et al. 2012; Jin et al. 2009). Il reste toutefois à établir si ces protéines interviennent via la conformation de l'ARN messenger cible ou si elles peuvent stabiliser le recrutement du complexe RISC via une interaction avec ce complexe.

II. Régulation par les miARN

Au-delà de la similarité des propriétés d'un miARN et d'un siARN et du fait que ces deux types de petits ARN soient pris en charge par les protéines Ago, leur principale activité biologique est un silencing post-transcriptionnel de l'expression. Pourtant les mécanismes sont différents puisque la coupure de l'ARNm cible n'intervient pas dans la régulation induite par les miARN. Néanmoins, les miARN peuvent diminuer l'abondance de leurs cibles en diminuant leur demi-vie. Ceci a lieu principalement via la déadénylation du transcrit et sa dégradation par les voies « normales » d'élimination des ARNm (déadénylation, décoiffage, dégradation exonucléolytique 5' et 3'). Les miARN peuvent de plus diminuer le rendement de la traduction par plusieurs voies : l'inhibition de l'initiation de la traduction, l'arrêt de l'élongation de la traduction, la terminaison prématurée de la traduction ou la dégradation de polypeptides naissants en cours de traduction (Carthew & Sontheimer 2009; Eulalio, Huntzinger & Izaurralde 2008a; Filipowicz et al. 2008). Pour les mécanismes au niveau de la traduction, il est envisagé que la présence prolongée de miRISC sur la molécule ciblée soit nécessaire pour la mise en place et le maintien de la régulation par les miARN. Dans un tel schéma, la régulation par les miARN peut-être

facilement réversible si l'interaction de miRISC avec sa cible peut être régulée soit par une modification du complexe (par exemple une phosphorylation) ou par la fixation d'une protéine sur le transcrit qui serait capable de déplacer les miRISC. C'est ce deuxième modèle qui est proposé dans le cas de la réversion de la régulation de CAT-1 par miR-122 en situation de stress (Bhattacharyya et al. 2006). Ces mécanismes nécessitent le maintien d'une stœchiométrie entre les cibles et le régulateur, ce qui compte tenu du nombre de cibles et de l'abondance de certains ARNm implique soit une très forte accumulation de miARN soit que la régulation est limitée par la trop faible abondance des miARN. Ces différentes contraintes sont intégrées de manière plus ou moins explicite dans la description des miARN comme des régulateurs d'appoint de l'expression génétique qui ne seraient capables que d'ajuster le niveau d'expression de leurs cibles.

Chez les eucaryotes, un ARNm mature possède une coiffe m⁷G à l'extrémité 5' et une queue poly(A) à l'extrémité 3'. La présence de ces structures aux extrémités de l'ARNm contribuent à sa stabilité et à sa traduction (Derry et al. 2006) car, d'une part, elles protègent de l'action des exonucléases, et d'autre part, l'interaction entre elles est essentielle pour le recrutement efficace de la machinerie de traduction sur un ARNm. Brièvement, eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) se fixe sur la coiffe, induit la formation du complexe eIF4F comprenant des facteurs d'initiation dont eIF4G (eukaryotic Initiation Factor 4G), ce dernier interagit avec la protéine PABPC (Cytoplasmic Poly(A)-Binding Protein) fixée sur la queue poly(A), cette interaction met en place une structure circulaire de l'ARNm et stimule le recrutement du ribosome et l'initiation de la traduction (Derry et al. 2006; Filipowicz et al. 2008; Wells et al. 1998). Les données existantes suggèrent que les miARN sont capables d'altérer la traduction et la stabilité de l'ARNm en interférant avec la fonction du complexe eIF4F et la PABPC (Huntzinger & Izaurralde 2011).

En tant que partenaires directs des petits ARN régulateurs, les protéines Ago sont les premières candidates pour agir sur l'expression des gènes cibles. Dans le cas de l'interférence par l'ARN sur une cible parfaite, Ago2 « trancheuse » est la seule protéine Ago indispensable chez les mammifères (J. Liu et al. 2004; Meister et al. 2004; Mescallchin et al. 2010) car elle est la seule possédant l'activité endonucléolytique (J. S. Parker & Barford 2006; Peters & Meister 2007; Tolia & Joshua-Tor 2007). Bien que Ago1 puisse couper le brin passager d'un duplex miARN/miARN* (B. Wang et al. 2009a), Ago1, 3 et 4

ne coupent pas un ARNm cible même si l'appariement petit ARN/cible est parfait (Tolia & Joshua-Tor 2007). Par contre, dans les cellules murine Ago2^{-/-}, la régulation par les miARN sur les cibles imparfaites est maintenue (J. Liu et al. 2004) indiquant que Ago1, 3, 4 sont effectivement compétentes pour la régulation en mode miARN (mode imparfait). C'est seulement dans le cas où toutes les protéines Ago sont absentes que cette régulation disparaît (Su et al. 2009). L'inhibition de l'expression des différentes protéines Ago dans des cellules humaines altère l'activité des miARN, Ago1 et Ago2 apparaissant comme les plus impliquées (Mescalchin et al. 2010).

A. Inhibition de la traduction

Les premières observations faites chez *C. elegans* montraient que la régulation par les miARN n'entraînait ni une diminution de la quantité d'ARNm, ni la dissociation des polyribosomes (Wightman et al. 1993). Ces données suggéraient donc que les miARN agissaient sur une étape tardive de la traduction (au cours de l'élongation) ou même via une dégradation co-traductionnelle de la protéine naissante (Olsen & Ambros 1999). Cependant, depuis ces premiers travaux, la majorité des données suggèrent que les miARN affectent l'initiation de la traduction de l'ARNm cible d'une manière dépendant de la coiffe. Ainsi, dans des cellules humaines en culture, les ARNm cibles du miARN *let-7* ne sont pas détectés dans les fractions de polysome indiquant qu'ils ne sont pas en cours de traduction (Pillai et al. 2005). Le blocage de la traduction a lieu probablement à l'étape de la reconnaissance de la coiffe par eIF4E, puisque la traduction des ARNm portant les même cibles n'est pas inhibée par le miARN *let-7* si elle est conduite par un mécanisme d'initiation indépendant de la coiffe (Humphreys et al. 2005; Pillai et al. 2005).

Cette conclusion est corroborée par des études *in vitro* en lysats cellulaires. D'abord, contrairement à celle des ARNm ayant une coiffe naturelle m7G, la traduction des ARNm avec une coiffe artificielle n'est pas régulée par les miARN, ils ont toutefois un taux basal de traduction plus faible qui reflète l'importance de la coiffe pour l'initiation de la traduction (Mathonnet et al. 2007). Deuxièmement, des miARN ne peuvent inhiber les ARNm dont la traduction est initiée par un IRES (Internal Ribosome Entry Site) qui permet une traduction indépendante de la coiffe (Mathonnet et al. 2007; Wakiyama et al. 2007). Troisièmement, la régulation induite par des miARN peut être supprimée en augmentant la quantité d'eIF4F dans le système expérimental (Mathonnet et al. 2007).

L'action de miRISC sur la reconnaissance de la coiffe par eIF4F n'est pas complètement comprise. Il a été démontré que la protéine Ago2 peut se fixer sur la coiffe m⁷G via son domaine MC (Frank et al. 2011; Kiriakidou et al. 2007), les mutations des résidus cruciaux de ce domaine sur Ago2 la rendent non fonctionnelle pour l'inhibition de la traduction dans des cellules humaines suggérant la possibilité qu'Ago2 inhibe l'initiation de la traduction en gênant l'interaction entre eIF4E et la coiffe, indiquant une des directions pour les études ultérieures (Kiriakidou et al. 2007). Toutefois, l'interprétation de ces observations est contestable (Kinch & Grishin 2009).

En dépit des arguments en faveur d'une inhibition de l'initiation de la traduction par les miARN, d'autres données sont en faveur d'une inhibition plus tardive. Dans les premières études effectuées chez *C. elegans*, non seulement l'abondance des ARNm ciblés par des miARN n'est pas diminuée (Olsen & Ambros 1999; Seggerson et al. 2002), mais ils sont retrouvés, avec leur miARN régulateurs, dans les fractions de polysomes (Olsen & Ambros 1999; Seggerson et al. 2002). Des observations similaires ont été constatées dans certaines études effectuées dans les cellules de mammifère (Maroney et al. 2006; Nottrott et al. 2006; Petersen et al. 2006). De plus, en présence des facteurs inhibiteurs de la traduction, ces polysomes réprimés, comme les polysomes ordinaires, se dissocient en monosomes (monoribosomes) ou en sous-unités de ribosome (Maroney et al. 2006; Nottrott et al. 2006; Petersen et al. 2006). L'ensemble de ces résultats est donc en faveur d'une action des miARN sur l'élongation avec un maintien de l'initiation (Huntzinger & Izaurralde 2011). En accord avec un tel modèle, une étude réalisée avec un IRES a montré une répression de la traduction par les miARN (Petersen et al. 2006).

Deux classes de modèles ont été mis en avant afin d'expliquer une inhibition dynamique de la traduction au niveau post-initiation : la dégradation rapide des polypeptides naissants au cours de la traduction (Nottrott et al. 2006; Olsen & Ambros 1999) et la dissociation prématurée des ribosomes (Petersen et al. 2006). De fait, les polysomes formés sur les ARNm ciblés par des miARN se dissocient plus rapidement qu'en l'absence de répression suggérant une moindre stabilité des ribosomes sur l'ARNm (Huntzinger & Izaurralde 2011; Petersen et al. 2006). Mais, à l'heure actuelle, les données disponibles ne sont pas suffisantes pour étayer l'un ou l'autre de ces modèles.

B. Dégradation et déadénylation de l'ARNm cible

Chez les mammifères, sauf le cas où le miARN a une cible parfaitement complémentaire (Yekta et al. 2004), les miARN n'induisent pas la coupure endonucléolytique de leurs cibles. Cependant, et à la différence des premières observations chez *C. elegans*, une diminution de l'accumulation des ARNm cibles est très fréquemment observée dans les cellules de mammifère en culture en réponse à une régulation par les miARN (R. J. Jackson & Standart 2007). Aucune étude n'a mis en évidence que cette dégradation des ARNm dépendait d'une coupure endonucléolytique tandis que les machineries responsables du métabolisme normale des ARNm (voie de déadénylation, décoiffage, dégradation par les exonucléases 5' et 3') sont clairement impliquées (Behm-Ansmant et al. 2006; Eulalio, Rehwinkel, et al. 2007b; Eulalio, Huntzinger, et al. 2009b; Giraldez et al. 2006; Piao et al. 2010; Rehwinkel et al. 2005; Wu et al. 2006).

De fait, les études de transcriptome en réponse à une augmentation ou une diminution de l'activité des miARN ont pendant longtemps constitué la première source d'information sur les cibles de ceux-ci (Krützfeldt et al. 2005; Lim et al. 2005). Réciproquement, l'inactivation des gènes codant pour les protéines essentielles pour le silencing par les miARN (par exemple Dicer, Ago ou GW182) augmente l'accumulation des ARNm cibles (Eulalio, Rehwinkel, et al. 2007b; Eulalio, Huntzinger, et al. 2009b; Rehwinkel et al. 2006; Schmitter et al. 2006). L'ensemble de ces résultats indique que la dégradation des ARNm cibles est une conséquence très fréquente de la régulation par les miARN, au moins dans les cellules en culture. La comparaison du protéome et du transcriptome devrait permettre, en principe, de répondre de manière plus complète à la question de l'importance relative d'une régulation de la traduction et de la stabilité des ARNm par les miARN. Les premières études (Baek et al. 2008; Krützfeldt et al. 2005; Selbach et al. 2008) ont montré qu'il existait une bonne corrélation entre une régulation au niveau de la protéine et de l'ARNm, suggérant que dans ces conditions expérimentales (cellules en culture transfectées avec un miARN ou son inhibiteur), on n'observait pas de régulation purement au niveau de la traduction. Toutefois ces études sont assez imprécises puisque l'on compare des données qui utilisent des techniques très différentes (spectrométrie de masse et analyse du transcriptome). A ce stade on ne peut donc exclure que certains miARN aient une action plus importante au niveau de la production protéique qu'au niveau de la diminution d'ARNm (Petersen et al. 2006), que ce soit globalement ou sur certaines de

leurs cibles. D'autres approches comme les gradients de polysome (Hendrickson et al. 2009) ou l'empreinte ribosomique (Guo et al. 2010) ont l'avantage de fournir des données homogènes pour la mesure de la traduction et celle de l'abondance de l'ARNm. Ces études n'ont pas mis en évidence de population d'ARNm dont la traduction serait spécifiquement bloquée en réponse à un miARN et conforte la vision précédente d'une régulation agissant principalement au niveau de la stabilité des ARNm cibles. Toutefois cette conclusion s'applique principalement aux cellules en culture dans lesquelles on transfecte un miARN ou un inhibiteur de miARN.

Dans le cytoplasme, le métabolisme de la plupart des ARNm est assuré *in fine* par la voie de dégradation 5'-3', effectuée par l'exonucléase cytoplasmique XRN1, et par la voie de dégradation 3'-5', catalysée par l'exosome (Filipowicz et al. 2008; R. Parker & H. Song 2004). Dans tous les cas, les ARNm doivent préalablement être déprotégés en 3' par une dégradation de la queue poly(A) et en 5' par l'excision de la coiffe. Un schéma représentatif est démontré dans la Figure 13 (Eulalio, Behm-Ansmant, et al. 2007a) sur la dégradation de l'ARNm induite par la déadénylation. Ces deux étapes sont liées et la déadénylation est un préalable pour l'activation du décoiffage. La déadénylation est assurée par deux complexes enzymatiques CAF1-CCR4-NOT et PAN2/PAN3, le premier assurant un raccourcissement processif et le deuxième distributif. Le complexe CAF1-CCR4-NOT1 a été impliqué dans l'action des miARN que ce soit chez la Drosophile ou les mammifères (Huntzinger & Izaurralde 2011). Lorsque la queue poly(A) est trop courte pour être associée avec la PABPC (Cytoplasmic poly(A) Binding Protein), le complexe de décoiffage DCP2-DCP1 est activé et l'extrémité 5' de l'ARNm est exposée à XRN1 (Huntzinger & Izaurralde 2011). Les ARNm déadénylés sont aussi accessibles pour l'exosome qui les dégrade à partir de leur extrémité 3' (Filipowicz et al. 2008). La déadénylation constitue l'étape cruciale du contrôle de la demi-vie des ARNm, l'alternative qui peut être observée pour certains d'entre eux dépend d'une coupure endonucléolytique. Réciproquement, dans le cadre de l'action des petits ARN il est logique d'envisager que lorsque la coupure endonucléolytique ne peut avoir lieu, l'abondance des ARNm cibles soit régulée par la voie classique de dégradation.

INTRODUCTION

miARN et régulation par les miARN

Régulation par miARN : Dégradation de l'ARNm cible

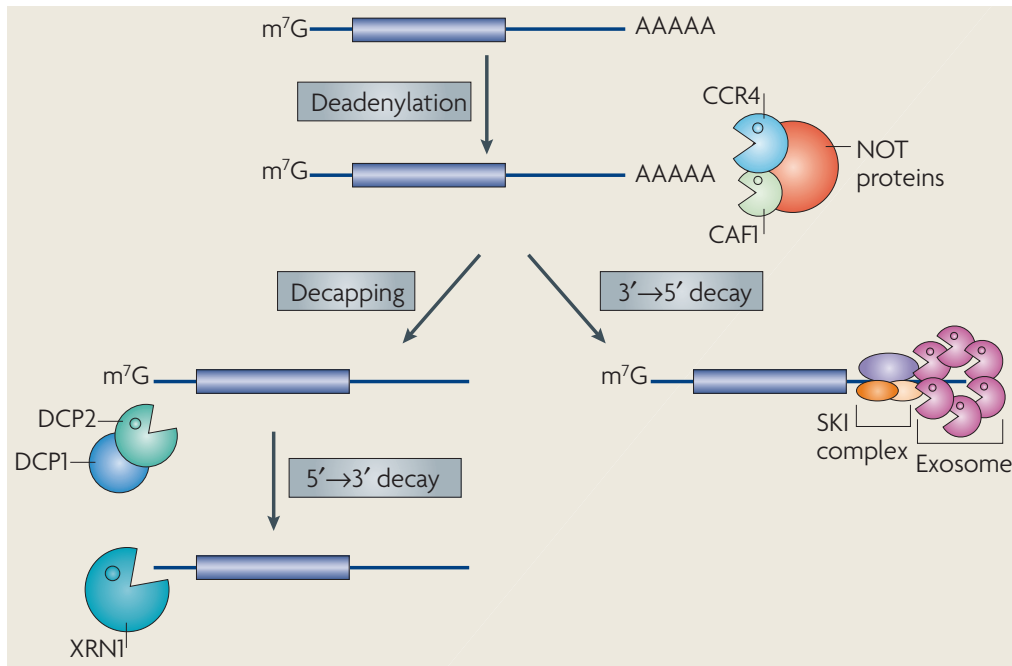


Figure 13, Contrôle de la stabilité des ARNm par la déadénylation (Eulalio, Behm-Ansmant, et al. 2007a). Les ARNm matures sont protégés de l'action des exonucléases par la coiffe à l'extrémité 5' et la queue poly(A) à l'extrémité 3'. La déadénylation des ARNm dans le cytoplasme initie sa dégradation. Ce processus est effectué par le complexe multiprotéique CAF1-CCR4-NOT qui raccourcit la queue poly(A) à partir de son extrémité 3' (une autre déadénylase PAN2/PAN3 intervient en amont du complexe CAF1-CCR4-NOT, mais contrairement à cette dernière elle n'est pas processive et n'est pas représentée sur ce schéma). Quand la queue poly(A) est suffisamment courte (quelques bases adénine), l'exosome peut dégrader l'ARNm à partir de son extrémité 3' (avec l'assistance des cofacteurs). Les ARNm déadénylés sont aussi sujet au décoiffage qui est assuré par le complexe DCP1-DCP2. Une fois la coiffe m⁷G est enlevée, l'extrémité 5' de l'ARNm est accessible l'exonucléase XRN1, qui le dégrade à partir de son extrémité 5'.

Une déadénylation des ARNm ciblés par des miARN a été mise en évidence chez différents espèces (Behm-Ansmant et al. 2006; Eulalio, Rehwinkel, et al. 2007b; Giraldez et al. 2006; Wu et al. 2006). Plus précisément, la déplétion des membres du complexe de déadénylation CAF1-CCR4-NOT conduit à une augmentation de la plupart des ARNm qui sont cibles démontrées ou prédites de miARN (Behm-Ansmant et al. 2006; Eulalio, Huntzinger, et al. 2009b), ce qui suggère que la dégradation des ARNm induite par les miARN dépend généralement de la déadénylation dans ces systèmes expérimentaux. Les ARNm déadénylés sont ensuite décoiffés et dégradés (Bagga et al. 2005; Behm-Ansmant et al. 2006; Eulalio, Huntzinger, et al. 2009b; Piao et al. 2010; Wu et al. 2006). Si les facteurs de décoiffage sont inhibés, ces ARNm déadénylés s'accumulent mais leur traduction est nettement moins efficace (Eulalio, Rehwinkel, et al. 2007b). Dans les lysats

cellulaires, les ARNm cibles de miARN sont souvent accumulés sous forme déadénylée (Fabian et al. 2009; Iwasaki et al. 2009; Wakiyama et al. 2007; Zdanowicz et al. 2009). Indépendamment de la dégradation des ARNm déadénylés, la diminution de la longueur de la queue poly(A) à elle seule est suffisante pour diminuer l'efficacité de la traduction.

Le mécanisme par lequel les miRISC induisent une déadénylation fait l'objet de nombreux travaux ces dernières années. Tout d'abord il semble bien que les protéines Ago à elles seules ne soient pas capables d'induire une déadénylation. Par contre, les protéines de la famille GW182 (TNRC6A, B et C chez les mammifères) qui interagissent avec les protéines Ago sont nécessaires pour la régulation par les miARN (Behm-Ansmant et al. 2006; Ding et al. 2005; Eulalio, Huntzinger & Izaurralde 2008b; Rehwinkel et al. 2005) et à ce titre sont des candidats qui joueraient un rôle dans la déadénylation (Huntzinger & Izaurralde 2011).

C. Protéines GW182/TNRC6

Si les protéines Ago sont les partenaires directs des petits ARN, les protéines GW182 qui interagissent avec elles semblent être les acteurs clés de l'assemblage des complexes miRISC (leur rôle dans le silencing en mode parfait n'est ni établi ni exclu (Jakymiw et al. 2005; J. Liu, Rivas, et al. 2005a; Rehwinkel et al. 2005)). Les protéines de la famille GW182 sont impliquées dans le métabolisme des ARN et elles sont des éléments indispensables à la formation des foyers cytoplasmiques (P-bodies). GW182 a d'abord été identifiée chez l'homme à partir d'un sérum autoimmun, mais des homologues existent chez les vertébrés, la drosophile et déjà dans une forme plus éloignée chez *C. elegans* (Ding & M. Han 2007; Eulalio, Triteschler & Izaurralde 2009c). Il n'existe pas d'homologue identifiable chez les champignons ou les plantes, mais il existe des protéines contenant des répétitions GW (glycine/tryptophane) qui pourraient remplir des fonctions apparentées. Les mammifères possèdent trois protéines GW182, nommées TNRC6A à TNRC6C, la fonction de ces protéines pourrait être partiellement redondante car elles sont capables d'interagir avec chacune des protéines Ago (Jakymiw et al. 2005; Lazzaretti et al. 2009; Lian et al. 2009; J. Liu, Rivas, et al. 2005a; Meister et al. 2005; Takimoto et al. 2009; Zipprich et al. 2009) ; une seule protéine GW182 a été trouvée chez la drosophile tandis que chez le nématode deux analogues fonctionnels AIN-1 et AIN-2 ont été identifiés.

a. Organisation fonctionnelle des GW182

La taille des protéines GW182 est d'environ 182 kDA et la présence de nombreuses répétitions de glycine et tryptophane (Eystathioy et al. 2002) leur a valu cette désignation de GW182. Les répétitions GW/WG sont réparties de manière inégale le long de la molécule (Eulalio, Tritschler & Izaurralde 2009c). L'organisation structurale des protéines GW182 est variée, mais deux régions principales (N-terminale et C-terminale) correspondant à deux domaines fonctionnels peuvent être identifiés chez les différents membres de la famille (Eulalio, Tritschler & Izaurralde 2009c). La Figure 14 est un schéma simplifié des domaines identifiés le long de la molécule GW182 (Fabian et al. 2011).

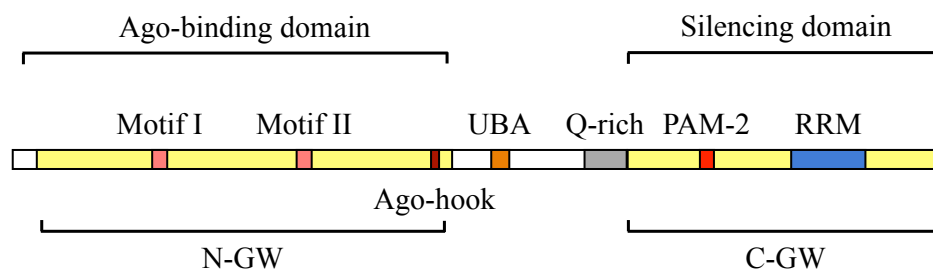


Figure 14, Organisation fonctionnelle des protéines GW182/TNRC6. Les protéines GW182/TNRC6 possèdent 2 régions fonctionnelles importantes : la région N-terminale et la région C-terminale. La région N-terminale est riche en répétitions GW/WG, qui établissent l'interaction avec les protéines Ago. L'ensemble de la région C-terminale assure la régulation par les miARN. Cette région est capable de recruter différents complexes de déadénylation (CAF1-CCR4-NOT, PAN1-PAN2) et induit la déstabilisation des ARNm ciblés par un miARN. Le motif PAM2 situé dans cette région peut interagir avec la protéine PABPC, ce qui pourrait mettre les protéines GW182 en compétition avec le facteur d'initiation de traduction eIF4E pour l'interaction avec cette protéine.

La partie N-terminale des protéines GW182 contient la majorité des répétitions GW et deux motifs conservés (Motifs I et II), certains membres de famille GW182 contiennent un troisième motif conservé à la fin de cette région nommé « Ago-hook » (l'hameçon à Ago) (Behm-Ansmant et al. 2006; Till et al. 2007). La présence des répétitions GW dans des nombreuses protéines est souvent déterminante pour leur l'interaction avec les protéines Ago (Behm-Ansmant et al. 2006; El-Shami et al. 2007). De fait, la région N-terminale avec ses répétitions GW est responsable de l'interaction entre les protéines GW182 et les protéines Ago (Behm-Ansmant et al. 2006; Lazzaretti et al. 2009; Lian et al. 2009; Takimoto et al. 2009; Till et al. 2007; Zipprich et al. 2009). Certaines données soulignent

que les motifs conservés jouent un rôle plus important que le reste de la région N-terminale, et le Motif I est suffisant pour l'interaction entre GW182 et Ago1 chez la drosophile (Eulalio, Helms, et al. 2009a), néanmoins, l'interaction entre les GW182 et les protéines Ago est seulement légèrement altérée chez l'homme quand les Motifs I et II (et Ago-hook éventuel) sont délétés, suggérant que le reste des répétitions GW contribuent aussi à cette interaction (Lazzaletti et al. 2009). D'ailleurs, Takimoto et al. démontrent que les protéines GW182 possèdent plusieurs sites responsables à la liaison GW182/Ago (Takimoto et al. 2009), cette caractéristique pourrait leur permettre de constituer des supra-complexes lorsque plusieurs séquences cibles sont présentes sur la même molécule d'ARNm.

C'est le domaine PIWI des protéines Ago qui recrute les protéines GW182 (Behm-Ansmant et al. 2006; Till et al. 2007), les résidus du domaine MID qui constituent la poche basique pour la liaison de l'extrémité 5' du petit ARN contribuent aussi à l'interaction Ago/GW182 (Eulalio, Triteschler & Izaurralde 2009c; Ma et al. 2005). La région riche en tryptophane du domaine PIWI a une affinité pour les répétitions GW des protéines GW182 (Lian et al. 2009; Schirle & MacRae 2012). L'interaction entre le domaine PIWI et les protéines GW182 est cruciale pour la mise en place de la régulation par les miARN et pour la localisation des protéines Ago dans le cytoplasme, l'ancrage d'une protéine Ago tronquée contenant ce domaine sur les ARNm via l'interaction λ N/BoxB est suffisant pour le recrutement des GW182 et l'inhibition de leur traduction (Lian et al. 2009).

Comment les répétitions GW interagissent avec le domaine PIWI des protéines Ago est une question ouverte. Très récemment, la structure d'Ago2 humaine a été résolue et les résultats de ces études indiquent la présence dans son domaine PIWI des structures permettant la liaison de tryptophanes (Schirle & MacRae 2012). Cette observation est en accord avec les approches biochimiques qui ont montré que les résidus tryptophanes des répétitions GW dans les protéines GW182 sont cruciaux pour l'interaction GW182/Ago (El-Shami et al. 2007; Till et al. 2007). Par ailleurs, il faut noter que non seulement les répétitions GW elles-mêmes, mais aussi les séquences qui les entourent pourraient affecter leur affinité avec les protéines Ago (Eulalio, Helms, et al. 2009a; Lazzaletti et al. 2009; Till et al. 2007). L'équipe de Chan a observé une interaction entre le domaine PIWI d'Ago2 humaine et un fragment de GW182 dont tous les tryptophanes sont substitués par l'alanine (Lian et al. 2009) illustrant la difficulté à identifier un seul motif d'interaction.

La région N-terminale de GW182 est aussi indispensable pour sa localisation dans les P-bodies, les mutants de GW182 délétés de cette région perdent à la fois l'affinité pour les protéines Ago et l'accumulation spécifique dans les P-bodies (Behm-Ansmant et al. 2006; Eulalio, Helms, et al. 2009a; Lazzaretti et al. 2009). Dans le cas de certains membres de la famille GW182, cette accumulation nécessite l'assistance de la région riche en glutamine qui se situe dans la région centrale de molécule (Eulalio, Helms, et al. 2009a; Lazzaretti et al. 2009). La portion C-terminale de cette région comprenant le Ago-hook est impliquée dans la répression de la traduction car l'ancrage de ce fragment protéique sur les ARNm diminue leur niveau d'expression (Yao et al. 2011) au moins dans certaines études.

La région C-terminale des protéines GW182 contient un domaine RRM (**R**NA-**R**ecognition **M**otif) et un domaine PAM-2 (**P**ABPC-interacting **M**otif 2), en plus, elle contient également des répétitions GW (Eulalio, Tritschler & Izaurralde 2009c; Fabian et al. 2009; Jinek et al. 2010; Kozlov et al. 2010). Cette région est la partie « effectrice » des protéines GW182 qui assure le silencing par les miARN. La protéine GW182 de drosophile délétée de la région C-terminale perd sa capacité à induire le silencing (Eulalio, Helms, et al. 2009a), réciproquement, l'ancrage de la protéine tronquée contenant uniquement cette région sur la région 3' non codante des ARNm inhibe leur expression (Lazzaretti et al. 2009). En accord avec les données globales obtenues en cellules de mammifère, les protéines GW182 sont aussi impliquées dans la déadénylation des ARNm cibles (Behm-Ansmant et al. 2006; Braun et al. 2011; Chekulaeva et al. 2011; C. Chen et al. 2009; Fabian et al. 2011; Jinek et al. 2010). Plusieurs équipes ont identifié des motifs dans la région C-terminale de GW182 qui permettent le recrutement du complexe CCR4-NOT (Chekulaeva et al. 2011; Fabian et al. 2011). Jinek et ses collègues ont identifié le domaine PAM-2 qui recrute l'autre complexe de déadénylation PAN1-PAN2 via son interaction avec la protéine PABPC (Jinek et al. 2010). Les tryptophanes dans ces différents motifs semblent jouer un rôle important durant le recrutement des complexes de déadénylation par les protéines GW182 (Chekulaeva et al. 2011; Fabian et al. 2011; Jinek et al. 2010). Enfin, l'équipe d'Izaurralde a montré que la région C-terminale des protéines GW182 a une affinité élevée avec la protéine PABPC1, elles sont probablement des compétiteurs d'eIF4E pour la protéine PABPC1. Cette observation suggère que GW182 pourrait aussi inhiber la traduction des ARNm cibles en interférant avec la mise en place de leur structure circulaire (Zekri et al. 2009).

D'autres fonctions ont été également observées dans la région C-terminale de GW182. En coopération avec le domaine type UBA (**UB**iquitin-**A**ssociated), qui est situé dans la région centrale des protéines GW182 (Behm-Ansmant et al. 2006), le domaine PAM-2 est capable de recruter un autre partenaire impliqué dans le silencing par les miARN : EDD (Su et al. 2011). EDD est une E3 ubiquitine ligase, elle contient un domaine PABPC et un domaine UBA qui interagissent avec le domaine PAM-2 et le domaine type UBA des protéines GW182 respectivement (Su et al. 2011). Le mécanisme moléculaire de son implication dans la régulation par les miARN reste à être précisé.

Le domaine RRM est hautement conservé parmi les protéines GW182 (Eystathiou et al. 2002). Cependant, les études structurales indiquent qu'il n'a pas les caractéristiques attendues pour la liaison avec les ARN (Eulalio, Tritschler, Büttner, et al. 2009d). En effet, ce domaine contribue à l'inhibition de la traduction des ARNm ciblés par les miARN, mais il n'est pas indispensable pour cette fonction : les protéines GW182 délétées de ce domaine établissent un silencing partiel par des miARN exogènes tandis que l'ancrage des protéines GW182 dépourvues de ce domaine sur les ARNm peut inhiber leur traduction (Eulalio, Tritschler, Büttner, et al. 2009d; Yao et al. 2011).

b. Les protéines GW182 et la régulation par les miARN

Durant la régulation par les miARN, le rôle principal des protéines GW182 est de permettre le recrutement des protéines effectrices sur les ARNm cibles. D'un côté elles sont fixées sur les protéines Ago et les dirigent avec les ARNm qu'elles ciblent dans les P-bodies. Cette localisation est susceptible de faciliter le recrutement des déadénylases ou d'autres protéines effectrices sur les ARNm cibles via le domaine C-terminal de GW182. Ceci peut induire un silencing post-transcriptionnel de plusieurs manières : en perturbant la liaison entre la PABPC et eIF4E, via le raccourcissement de la queue poly(A) et en favorisant la dégradation des ARNm déadénylés. Une représentation schématique de l'implication des protéines GW182, en coopération avec des protéines Ago, dans la régulation par les miARN est visualisée dans la Figure 15 (Huntzinger & Izaurralde 2011).

INTRODUCTION

miARN et régulation par les miARN

Régulation par miARN : Protéines GW182

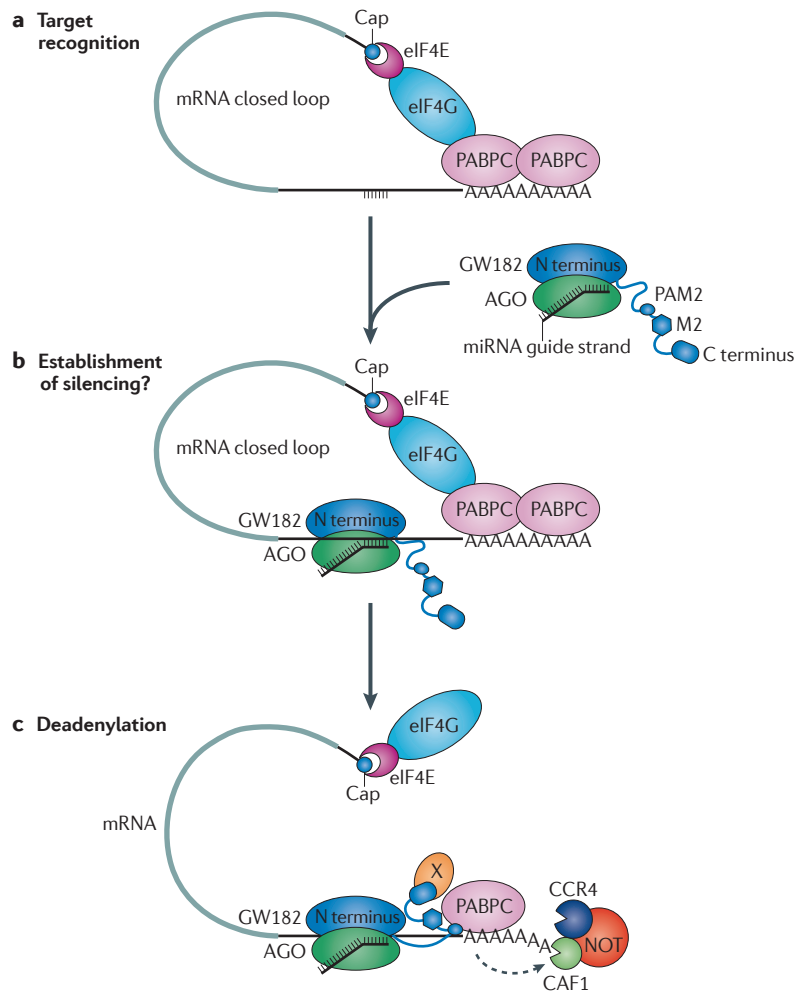


Figure 15, Implication des protéines GW182/TNRC6 dans le silencing par les miARN (Huntzinger & Izaurralde 2011). Les ARNm en traduction sont représentés sous une forme circulaire du fait de l'interaction entre les facteurs d'initiation de la traduction et les protéines PABPC (Cytoplasmic Poly(A) Binding Protein). Les complexes miRISC, localisés dans la région 3' non traduite des ARNm par les séquences cibles partiellement complémentaires, initient la déadénylation des ARNm cibles. La protéine GW182 est recrutée dans les miRISC par l'interaction avec la protéine Ago via sa région N-terminale, elle recrute ensuite les complexes de déadénylation CAF1-CCR4-NOT par sa région C-terminale. De plus, le motif PAM2, situé dans la région C-terminale de la protéine GW182, peut interférer avec l'interaction entre le l'eIF4E et les protéines PABPC car il interagit avec ces dernières à une affinité élevée, ainsi, il pourrait empêcher la formation de la structure circulaire de l'ARNm et diminuer le niveau de traduction.

D. Efficacité de la régulation par les miARN

a. Présence de plusieurs sites de fixation sur un même ARNm

Chez les plantes, les cibles des miARN se situent dans la région codante ou la région 3' non codante d'un ARNm. La complémentarité avec les miARN régulateurs est quasiment parfaite et la régulation passe par une coupure des ARNm similaire à l'interférence par l'ARN (Pillai et al. 2007). Il est cependant intéressant de noter que même dans ce contexte une régulation de la traduction contribue aussi au silencing (Brodersen et al. 2008). Dans le règne animal, la complémentarité entre les miARN et leurs cibles est presque toujours partielle et depuis les premiers travaux effectués chez *C. elegans* il a été constaté que les ARNm contiennent souvent plusieurs cibles pour le même miARN ou pour différents miARN (R. J. Jackson & Standart 2007; Pillai et al. 2007). Ce dernier point suggère qu'un mécanisme coopératif entre les complexes miRISC pourrait intervenir dans les régulations par les miARN, ce qui a effectivement été observé dans certains exemples. Toutefois, dès que la région 3' non traduite est un peu longue, une simple considération statistique prédit la présence de plusieurs sites de miARN. Comme une séquence d'amorçage est présente tous les 16 kb, si l'on considère qu'il existe 320 séquences d'amorçage différentes parmi les miARN humains, un site potentiel de miARN est présent tous les cinquante nucléotides.

Dans les expériences utilisant des plasmides rapporteurs, pour un couple miARN/cible donné, l'efficacité inhibitrice du miARN est corrélée avec le nombre de cibles présentes dans la région 3' non codante de l'ARNm (Broderick et al. 2011; Doench et al. 2003; Petersen et al. 2006). Cette observation suggère que les miRISC recrutés par les mêmes miARN sur le même ARNm pourraient coopérer entre eux afin de diminuer son expression. Les propriétés et la composition exacte des complexes miRISC ne sont pas encore clairement déterminées à ce jour, mais il est peu probable que la séquence du brin guide les modifie de manière significative (sauf effectivement la spécificité de la reconnaissance de cible). On peut donc supposer que les miRISC recrutés par différents miARN pourraient aussi coopérer entre eux. Si le mécanisme moléculaire de cette coopérativité n'est pas clairement identifié, l'équipe de Zamore a cependant montré que la distance entre les miRISC recrutés sur le même ARNm est un élément important pour leur coopération (Broderick et al. 2011).

D'une manière générale, la région 3' non codante des ARNm est riche en éléments régulateurs post-transcriptionnels qui affectent la localisation, la traduction et la demi-vie du transcrit. Il est donc plausible que les miRISC agissant dans cette région non seulement coopèrent entre eux, mais aussi interagissent avec d'autres facteurs régulateurs comme il a déjà été évoqué pour l'interaction du complexe miRISC. La dépendance du contexte au sein de la région 3' non traduite a été mise en évidence par les études de Didiano sur la régulation de *lsy-6* chez *C. elegans* (Didiano & Hobert 2006). Dans les cellules humaines d'hépatocarcinome soumises à un stress, les séquences riches en AU présentes dans la région 3' non codante du messenger CAT-1 recrutent la protéine HuR et permettent une suppression partielle de la régulation par miR-122 (Bhattacharyya et al. 2006). Ces observations indiquent qu'au-delà de la présence des cibles de miARN sur un ARNm, l'efficacité de la régulation par les miARN dépend des autres régulations agissant sur ce messenger. Cette intégration des régulations par les miARN parmi les autres régulations post-transcriptionnelles marque une autre différence avec le mode d'action sur une cible parfaite où aucun lien entre l'activité de coupure et le contexte adjacent de la séquence cible n'a été démontré, du moins si la séquence cible est accessible.

b. Conséquences d'un mode d'action stœchiométrique

Si l'action des miARN repose vraiment sur un mécanisme stœchiométrique entre les miARN et les ARNm cibles, il en résulte une contrainte directe sur le rapport entre le nombre de molécules de miARN endogènes et d'ARNm cibles au sein d'une cellule. Peu d'études ont essayé de déterminer précisément la concentration des miARN dans une population cellulaire, mais les approches qui calibrent le signal des miARN endogènes en introduisant une référence externe dans les extraits cellulaires (un miARN de synthèse) indiquent que les miARN abondants s'accumulent à des niveaux de plusieurs milliers de copies par cellules (Gaur et al. 2007), dans le cas de miR-122 qui est le miARN prédominant dans les hépatocytes, 50 000 à 100 000 molécules de miR-122 sont présentées dans chaque cellule (Chang et al. 2004). En ce qui concerne le nombre de cibles, si l'on prend les résultats des études de protéomique, on voit la quantité de protéines diminuer de manière significative pour une centaine de gènes dont les ARNm contiennent au moins un site de fixation pour le miARN considéré. L'abondance des ARNm varie entre quelques copies par cellule et quelques milliers pour les plus abondants. En prenant une valeur moyenne d'une dizaine de copies, on peut donc estimer le nombre de cibles à un

millier. Ce chiffre est probablement une sous-estimation puisque certains des ARNm peuvent contenir plusieurs sites de fixation (jusqu'à sept dans quelques cas bien décrits comme pour la fixation de *let-7* sur HMGA2 (Mayr et al. 2007)). Si les chiffres sont susceptibles de différer en fonction du miARN et du type cellulaire, on peut considérer que le nombre de cibles qui inclut une population d'une centaine d'ARNm varie moins que le niveau d'expression du miARN qui est compris entre 0 et 10 000 dans la plupart des cas. Ces estimations suggèrent que seuls les miARN les plus exprimés seraient en excès sur le nombre de cibles et donc que dans la majorité des cas, l'abondance des miARN serait limitante.

Ces considérations, qui découlent directement d'un mode d'action stœchiométrique et d'une estimation du nombre de cibles, sont depuis longtemps en arrière-plan de certaines réflexions sur le rôle biologique des miARN. Ainsi en 2007, le laboratoire de P. Sharp a proposé l'utilisation d'éponges à miARN comme une alternative aux approches de génétique pour étudier les activités biologiques des miARN (Ebert et al. 2007). Le résumé de l'article décrit ainsi cette stratégie : « these competitive inhibitors are transcripts expressed from strong promoters containing multiple tandem binding sites to a microRNA of interest ». Effectivement, dans des expériences de transfection transitoire la présence de ces éponges diminue l'efficacité de la régulation par le miARN ciblé (Ebert et al. 2007). Cette approche diffère de celles qui avaient pu être développées auparavant, l'utilisation de petits ARN modifiés pour séquestrer les complexes RISC, par le fait qu'ici l'éponge est une cible légitime du miARN que l'on veut inhiber. L'hypothèse de départ est que l'abondance supraphysiologique de substrats conduit à une saturation de la régulation par les miARN et assure une durée de vie plus longue à ces substrats. Toutefois, le même effet peut être observé avec des transcrits qui contiennent des cibles parfaites et qui peuvent donc être dégradés par un mécanisme catalytique. Ceci suggère qu'il est aussi possible de saturer la régulation en mode siARN (mode parfait). Ce dernier point constitue une indication indirecte que l'activité sur une cible parfaite n'est pas aussi différente de celle sur une cible imparfaite qu'habituellement proposé. Cet aspect est encore renforcé par l'observation que des éponges naturelles (Franco-Zorrilla et al. 2007) ou artificielles (Ivashuta et al. 2011) à miARN fonctionnent aussi chez les plantes en diminuant le silencing de cibles naturelles. Comme le silencing observé est dû, en première approximation, à une coupure endonucléolytique, cette titration des miARN affecte aussi une activité catalytique.

c. Robustesse de la régulation

Un mécanisme de régulation stœchiométrique est a priori peu robuste, il suffit que l'expression de la cible augmente pour qu'elle puisse échapper à cette régulation. Ainsi au lieu de stabiliser l'expression d'un gène comme pourrait le faire un rétrocontrôle, une régulation de ce type tend à amplifier les fluctuations qui ont lieu en amont, par exemple au niveau de la transcription. Une telle situation est très éloignée du rôle de maintien de l'homéostasie cellulaire que l'on veut faire jouer aux miARN. Tout en restant dans le cadre d'un mécanisme stœchiométrique, une stabilisation de l'agent régulateur par son substrat peut permettre de contourner cette difficulté. Chez *C. elegans* il a été observé que la présence d'une mutation dans la séquence d'amorçage de *let-7* conduisait à une diminution de l'accumulation du miARN mature. Pourtant, le niveau de pré-miARN détecté n'est pas modifié et *in vitro* la maturation du pré-miARN muté est identique à celle de l'allèle sauvage (Chatterjee & Großhans 2009). L'expression à partir d'un transgène d'un transcrite cible de l'allèle muté permet d'augmenter l'accumulation du miARN muté aux niveaux comparables avec ceux de l'allèle sauvage. Cette réponse reflète une instabilité du miARN en présence de la protéine Argonaute impliquée dans la régulation des transcrits cibles (ALG-1 et ALG-2 chez *C. elegans*) due à la dégradation du brin guide par les deux exoribonucléases 5' de *C. elegans*, XRN1 et XRN2. En présence d'une cible (complémentaire dans la région d'amorçage) cette dégradation est plus faible, ce qui conduit à une augmentation du niveau détectable de miARN mature. Dans toutes les discussions sur l'accumulation des miARN, il est considéré que seuls les miARN associés à une protéine Argonaute ont une durée de vie suffisante pour s'accumuler dans la cellule. Si cette hypothèse est plausible, on peut quand même remarquer que tous les miARN extracellulaires qui sont détectés dans les fluides biologiques ne sont pas associés à une protéine Argonaute et donc qu'il existe peut-être d'autres moyens de stabiliser un miARN simple brin. Toutefois dans le cas des expériences chez *C. elegans*, XRN1 et XRN2 contrôlent l'activité biologique du miARN et la dégradation concerne le brin guide d'un miARN pris en charge par un complexe miRISC (Chatterjee et al. 2011). Ainsi, il est possible que l'incorporation dans un complexe miRISC ne soit pas suffisante pour stabiliser le brin guide.

Jusqu'à présent un tel mécanisme de stabilisation n'a pas été mis en évidence chez les mammifères. Dans leur grande majorité, les miARN sont stables dans les cellules après

une inhibition de la transcription ou de Dicer (Bail et al. 2010). Cependant, la déstabilisation des miARN en présence de leurs cibles a été observée dans différents modèles (Ameres et al. 2010; Baccarini et al. 2011). Chez la drosophile, l'existence de deux voies parallèles spécialisées dans le silencing en mode siARN et miARN permet d'intégrer cette déstabilisation dans un modèle cohérent (Ameres et al. 2010). En effet, la dégradation du miARN en présence de sa cible est initiée par l'addition de nucléotides en 3', de plus cette extension n'a lieu que lorsque la complémentarité entre miARN et sa cible est importante dans la région 3' du miARN (un mode parfait ou presque parfait). Or, chez la drosophile le silencing en mode parfait est assuré par Ago2 qui reçoit préférentiellement les siARN par rapport aux miARN et les petit ARN associés à Ago2 sont modifiés par une 2'-O méthylation due à l'enzyme Hen1 qui bloque l'addition de nucléotides. Les miARN, qui sont principalement associés à Ago1, ne sont pas protégés de cette extension et lorsqu'ils agissent sur des cibles presque parfaites vont être dégradés après extension en 3'. Ainsi, cette déstabilisation des miARN peut contribuer à renforcer la séparation entre les voies siARN et miARN. L'observation que ce mécanisme d'extension-dégradation existe chez les mammifères est par contre plus difficile à intégrer puisque dans ce cas il n'existe pas de séparation connue des modes siARN et miARN (Ameres et al. 2010).

L'absence de robustesse d'un mode stœchiométrique est encore renforcée si l'on considère que les miARN sont dégradés en présence de leurs cibles. Pour répondre à cette difficulté biologique fondamentale, H. Seitz a proposé que toutes les cibles d'un miARN ne soient directement des cibles dont le niveau d'expression soit à réguler, mais qu'elles puissent servir à stabiliser la régulation (Seitz 2009). Ainsi, la multiplicité des cibles servirait à tamponner la régulation puisque les fluctuations d'expression d'une cible donnée (en l'occurrence dont la régulation est importante pour le système biologique) ne modifient pas de manière significative le rapport entre la quantité de miARN et de la totalité de ses cibles. Un test direct de ce modèle est difficile à mettre en œuvre mais l'observation que dans la plupart des cas les approches génétiques ou les modèles *in vitro* n'identifient qu'un gène cible comme responsable de l'activité biologique du miARN (voire deux groupes dans le cas de let-7 : HMGA2 et les gènes *ras*) suggère effectivement que toutes les cibles n'ont pas la même importance biologique. De plus, comme il est assez facile de perdre les sites de fixation pour les miARN, surtout s'ils sont situés dans la région 3' non codante, le fait qu'un grand nombre de cibles ait été maintenu au cours de l'évolution est aussi en accord avec une pression de sélection positive pour cette multiplicité de cibles.

Une autre lecture du manque de robustesse a été proposée par P.P. Pandolfi. L'idée est qu'au cours de l'évolution, le manque de robustesse a été exploité comme un mode de régulation de l'expression. L'idée de départ est que parmi les cibles, seules certaines sont efficacement reconnues par les miARN et donc que la complexité mise en avant par H. Seitz n'est pas en fait mise en œuvre. Dans ce cas le rapport entre miARN et ARNm devient sensible à toute variation d'expression parmi ces cibles « fortes » et l'on aboutit à un couplage entre l'expression de ces ARNm. De fait, plusieurs données expérimentales sont en accord avec ce modèle de couplage. C'est par exemple le cas pour le gène PTEN et son pseudo gène PTENP1 qui partagent les mêmes sites de fixation pour les miARN mais dont un seul a une activité de gène suppresseur de tumeur (Tay et al. 2011; Poliseno et al. 2010). Dans le cas de la différenciation musculaire, l'ARN précurseur de miR-133 (l'ARN non codant linc-MD1) est aussi un compétiteur de miR-133 et de miR-155, son activité de précurseur et de compétiteur pouvant être dissociées (Cesana et al. 2011). Compte tenu de l'importance du réseau d'interactions entre les miARN et les ARNm cibles (avec en particulier des interactions croisées, un ARNm pouvant fixer plusieurs miARN), ce modèle de compétition conduit rapidement à l'idée que l'ensemble du transcriptome doit être dans un état de « cohérence interne » dans lequel un équilibre doit être réalisé entre les miARN et leurs cibles (Salmena et al. 2011). D'une certaine manière, l'idée d'un équilibre fonctionnel au sein d'une cellule est une évidence mais son application au niveau de l'expression génétique est inattendue puisque l'on s'attend à ce que ce soit le niveau d'expression génétique qui fixe l'équilibre final, or dans le modèle proposé on peut s'attendre à ce que tous les niveaux d'expression ne soient pas réalisables. Dans ce modèle les miARN joueraient un rôle bien au-delà de la régulation directe de l'expression génétique en introduisant un couplage fort entre presque tous les gènes.

Bilan

Les microARN (miARN) sont, comme les siARN, des petits ARN régulateurs capables d'induire un silencing de l'expression des gènes dans les cellules somatiques. Malgré la similarité importante entre les miARN et les siARN, leur biogenèse et leurs modes d'action sont différents. Les miARN sont issus de régions structurées présentes sur des transcrits simple brin et représentent donc un produit d'expression de gènes cellulaires, tandis que chez les mammifères, le rôle des siARN endogènes est incertain. Leur maturation nécessite 2 enzymes de la famille RNase III, Drosha dans le noyau et Dicer dans le cytoplasme. Les

protéines Ago interagissent directement avec le miARN et recrutent leurs cofacteurs pour former les complexes miRISC qui effectuent le silencing. Dans le règne animal, contrairement au cas de l'interférence par l'ARN induite par les siARN, les protéines Ago guidées par les miARN, même si elles possèdent une activité endonucléolytique spécifique de séquence, ne peuvent couper les ARNm cibles à cause des mésappariements présents dans l'hybride miARN/cible, l'intervention des autres membres de miRISC, notamment celle des protéines de la famille GW182, est indispensable pour le silencing en mode imparfait (mode miARN). Les complexes miRISC localisés sur la région 3' non codante de l'ARNm cible réduit sa stabilité via la déadénylation (induite par les protéines GW182) ou inhibe sa traduction. Le silencing par les miARN (silencing en mode imparfait) est supposé être moins efficace par rapport au silencing par les siARN (silencing en mode parfait) pour deux raisons : premièrement, la réaction catalytique des protéines Ago « trancheuses » ne peut avoir lieu sur les ARNm cibles, la mise en œuvre du silencing suit un chemin plus compliqué incluant plus de facteurs ; deuxièmement, l'ARNm cible contient souvent plusieurs séquences cibles pour les miARN suggérant qu'un complexe miRISC ne peut induire et maintenir un silencing efficace. Cependant, les évidences directes soutenant cette proposition sont encore limitées. De plus, le recyclage du miRISC durant le silencing a déjà été observé (Baccarini et al. 2011) indiquant que les complexes miRISC peuvent aussi fonctionner d'une manière catalytique. Le silencing par les miARN met probablement en œuvre plusieurs mécanismes et une description détaillée de cette voie de régulation reste à faire.

PARTIE II. RESULTATS

A mon arrivée dans le laboratoire, l'utilisation des protéines fluorescentes avait été développée pour analyser le silencing par les petits ARN sur une cible parfaite mais rien n'était disponible pour étudier la régulation par les miARN sur des cibles imparfaites. Le premier objectif était de réaliser des constructions qui puissent servir de référence pour la régulation par les miARN. J'ai donc tout d'abord créé les constructions pBiFluo-3milet7 et pBiFluo-3miCXCR4 qui sont directement dérivées de deux modèles classiques de la régulation par les miARN. La construction 3milet7 reprend la séquence des sites initialement utilisée par le groupe de W. Filipowicz, les différents membres de la famille *let-7* étant fortement exprimés dans les cellules embryonnaires et nettement moins dans les cellules différenciées. C'est pourquoi la lignée cellulaire HEK-293 qui a été dérivée de cellules embryonnaires de rein exprime un faible niveau de *let-7*.

Les données disponibles sur l'activité post-transcriptionnelle des miARN chez les mammifères suggèrent que leur effet sur l'expression des gènes cibles devrait être nettement moins efficace que celui des siARN agissant sur une cible parfaite. Cette idée répandue provient à la fois de données expérimentales, qui montrent des silencing moyens souvent compris entre 50 et 70 % au niveau protéique, et d'un mécanisme proposé pour l'action des miARN qui repose sur une action stœchiométrique par opposition avec l'action catalytique des siARN. Si les observations sur le silencing moyen existent, il est intéressant de noter qu'un mécanisme reposant sur un silencing traductionnel pur n'est pas vraiment étayé par les données expérimentales. En fait, peu de travaux ont essayé de quantifier précisément l'efficacité du silencing par les miARN.

La notion d'efficacité peut recouvrir plusieurs aspects dont le silencing moyen sur une population cellulaire, le silencing maximal atteint dans certaines cellules ou inversement, le silencing le plus faible ; mais aussi la dose efficace 50 d'un petit ARN régulateur ou la robustesse de la régulation vis-à-vis d'un changement d'expression du gène cible. Ce dernier point a fait l'objet de plusieurs travaux puisqu'il constitue un enjeu fondamental pour la robustesse de la régulation. S'il est tentant de vouloir faire jouer un rôle important aux miARN dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, un mécanisme stœchiométrique est à priori mal adapté puisque si la transcription du gène cible augmente, l'impact post-transcriptionnel va diminuer ou inversement si elle diminue il va s'accroître. Ainsi, à

RESULTATS

moins que miARN ne soit en large excès, le niveau post-transcriptionnel ne pourrait compenser les variations de transcription mais au contraire serait susceptible de les amplifier.

Le système rapporteur que possède notre équipe nous permet non seulement de mesurer précisément le niveau de la régulation par les petits ARNs d'un ensemble de cellules mais aussi de l'analyser au sein des différentes populations cellulaires. Les résultats obtenus avec ce système expérimental suggèrent que la régulation par les miARN est efficace, elle est comparable avec une régulation par les siARN ; le niveau de la régulation par les miARN est altéré si l'état des cellules est modulé ; la régulation par les miARN est considérablement perturbée quand le fonctionnement des mitochondries est bloqué. En plus, nos observations confirment que parmi les 4 protéines Ago chez les mammifères, Ago2 est l'acteur majeur dans la régulation par les miARN comme dans celle induite par les siARN.

Chapitre I. Etude comparative du silencing en mode siARN et en mode miARN

Dans cette partie j'ai cherché à comparer l'efficacité du silencing de l'expression du gène rapporteur sur une cible parfaite avec celle sur une cible imparfaite. J'ai tout d'abord mesuré le silencing à partir de la fluorescence moyenne de l'ensemble des cellules (ou du moins de l'ensemble des cellules qui expriment fortement la construction indicatrice). En réalisant des doses-réponse on peut extraire deux informations sur l'efficacité du silencing : le silencing maximal et la dose efficace 50. Pour l'approche expérimentale j'ai utilisé des constructions qui contiennent soit un site parfait, soit un ou plusieurs sites imparfaits pour le même petit ARN, ce qui permet d'induire une régulation en « mode siARN » (*régulation sur une cible parfaite*) ou une régulation en « mode miARN » (*régulation sur une cible imparfaite*). L'avantage de cette approche sur l'utilisation de deux ARNm avec des séquences différentes pour le même petit ARN est de s'assurer que la biodisponibilité du petit ARN soit la même dans les deux mesures. Il est par ailleurs peu probable que les petites différences de séquence entre les deux types de constructions indicatrices jouent un rôle dans l'efficacité de leur transfection et de leur expression.

I. Caractérisation du silencing en mode miARN par les protéines rapporteuses fluorescentes

A. Présentation générale du système expérimental

Le système expérimental développé dans notre équipe, pour mesurer un silencing en mode miARN et en mode siARN, est fondé sur l'application de la cytométrie en flux. L'utilisation de gènes rapporteurs exprimant les protéines fluorescentes permet de mesurer leur expression au niveau de chaque cellule. Le marquage cellulaire pour adapter à cette méthode d'acquisition et d'analyse des données est assuré par la transfection du plasmide rapporteur dans chaque cellule. Pour cet effet, une série des plasmides rapporteurs ont été construits.

Les constructions indicatrices sont dérivées d'un plasmide de départ pBiFluo qui porte 2 gènes exprimant chacun une protéine fluorescente, DsRed et EGFP (Fig. 16). L'expression

de ces deux protéines est contrôlée par un promoteur bidirectionnel dont l'activité est inductible par la doxycycline ou la tétracycline dans les lignées cellulaires « Tet-On » (dans mon cas, les cellules HEK293 Tet-On) commercialisées par Clontech, Inc. Le principe de cette inductibilité des constructions indicatrices pBiFluo dérivées est détaillé dans la partie « *Matériels et Méthodes* ». Chaque cellule HEK293 Tet-On ayant reçu un plasmide de la famille pBiFluo va être observable à travers les deux couleurs dès lors que l'expression du plasmide est induite en ajoutant de la doxycycline dans le milieu de culture.

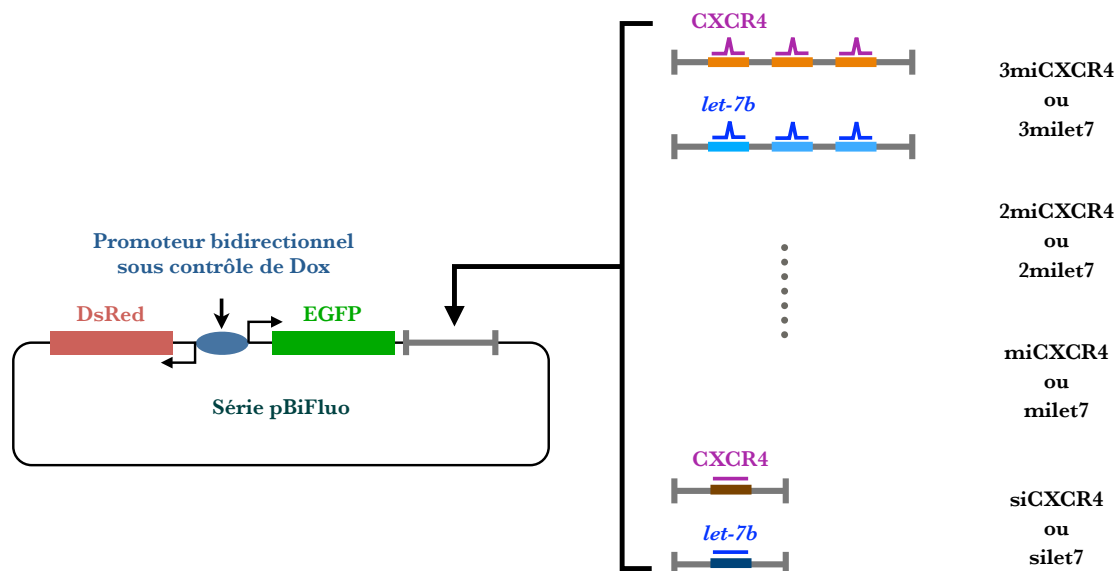


Figure 16, Présentation schématique des constructions indicatrices de la série pBiFluo. Les constructions indicatrices de cette série comportent deux gènes rapporteurs exprimant les protéines fluorescentes DsRed et EGFP dont l'expression est contrôlée par un promoteur bidirectionnel régulé par la doxycycline. La DsRed est un indicateur de l'activité du promoteur dans chaque cellule transfectée. L'EGFP est l'indicateur du silencing par les petits ARN car les séquences cibles partiellement ou parfaitement complémentaires avec les petits ARN régulateurs *let-7b* ou CXCR4 sont insérées en aval de sa région codante.

L'intérêt d'utiliser deux protéines fluorescentes est de pouvoir suivre le changement d'expression d'une protéine (EGFP) causé par un silencing par des petits ARN et d'avoir en même temps un contrôle interne (DsRed) indiquant l'activité du promoteur, et ce, dans chaque cellule. Ceci est particulièrement important dans le cas d'une transfection transitoire où l'activité du promoteur peut varier de manière importante entre cellules du fait de l'activité du transactivateur et du nombre de copies du plasmide qu'une cellule a reçu. Afin de rendre l'expression d'EGFP sensible à la régulation par les petits ARN, différentes séquences cibles partiellement ou parfaitement complémentaires avec les petits

ARN régulateurs *let-7b* ou CXCR4 ont été introduites en aval de la région codante d'EGFP (Fig. 16), ainsi l'expression d'EGFP pourra être régulée par ces petits ARN.

Les données obtenues par la cytométrie en flux contiennent beaucoup d'informations qui se rapportent théoriquement à chaque cellule analysée. Pour les exploiter il faut donc souvent restreindre l'analyse à une sous-population particulière et en dériver des valeurs moyennes ou d'autres paramètres qui permettent de décrire le comportement de l'ensemble des cellules.

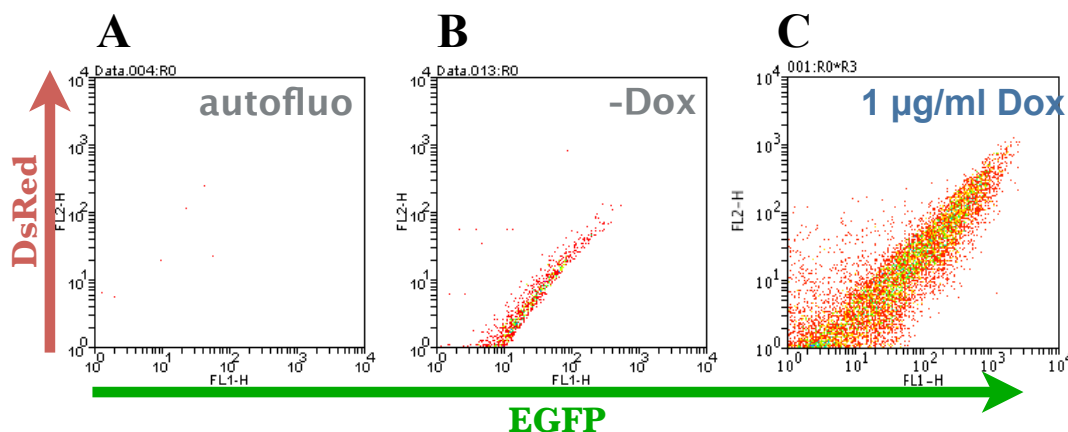


Figure 17, Expression des constructions indicatrices pBiFluo par transfection transitoire dans les cellules HEK 293 Tet-On. Les dot-plots indiquent l'intensité d'EGFP (axe X) et de DsRed (axe Y) dans chaque cellule analysée. Chaque point représente une cellule avec les valeurs d'EGFP et de DsRed correspondante, la couleur du point indique la densité des points, sur une échelle du rouge au vert (voire bleu ou violet quand la densité des points à une région donnée devient très élevée). **A)** Nuage de points pour un échantillon transfecté par le plasmide contrôle. **B)** Nuage de points pour un échantillon transfecté par le plasmide pBiFluo, l'expression des gènes rapporteurs n'est pas induite. **C)** Nuage de points pour un échantillon transfecté par le plasmide pBiFluo, l'expression des gènes rapporteurs est induite par 1 µg/ml de doxycycline 32 H avant l'analyse.

La Figure 17 présente quelques observations de base sur l'expression de nos constructions indicatrices. Il s'agit de la représentation des données en nuages de points dans laquelle chaque point correspond à une cellule, au moins en principe (voir plus bas). Dans cette présentation, l'intensité de fluorescence verte (mesurée dans le canal FL1) est présentée sur l'axe des X, tandis que l'intensité de fluorescence rouge (mesurée dans le canal FL2) est indiquée sur l'axe des Y. Ces 2 valeurs peuvent varier entre 1 et 10 000 et sont exprimées sur échelle logarithmique. Les cellules HEK293 Tet-On non marquées sont transfectées par un plasmide vide qui n'exprime aucune protéine fluorescente, le niveau d'autofluorescence

des cellules est faible comme montré dans la Figure 17A, très peu de cellules sont visibles dans ce nuage de points car le réglage des détecteurs ne permet pas de détecter l'autofluorescence des cellules (elle peut être mesurée avec un réglage de plus haute sensibilité comme il sera visible sur d'autres figures). Sur la Figure 17B, on observe la fluorescence des cellules transfectées avec la construction pBiFluo et maintenues en l'absence de doxycycline. Bien que l'activité du promoteur bidirectionnel soit en principe complètement dépendante de la présence de doxycycline dans le milieu de culture (pour plus de détails, voir la partie « **Matériels et Méthodes** »), on peut observer que quelques cellules (moins de 5 % parmi les cellules convenables à l'analyse) expriment les deux protéines fluorescentes. L'intensité de fluorescence des cellules est fortement augmentée en présence d'1 µg/ml de doxycycline dans le milieu, le pourcentage des cellules positives parmi les cellules convenables à l'analyse relève à plus de 50 % (Fig. 17C). En fait, le nuage de points représente une densité de cellules dans une région de valeurs de FL1 et FL2 donnée (la taille de cette région dépend du nombre de pixels dans le diagramme) : la couleur d'un point va de plus en plus vers le bleu en fonction du nombre de cellules qu'il représente (il s'agit des cellules dont les valeurs FL1 et FL2 sont exactement les mêmes déterminées à la résolution du cytomètre), un point rouge pouvant indiquer une cellule unique. On constate également que l'expression de DsRed et d'EGFP sont corrélées car le nuage de points se positionne le long de la diagonale du diagramme. Dans une expérience de transfection transitoire telle que celle-ci, la gamme d'expression des protéines fluorescentes dépasse les 4 log que permet de mesurer une seule analyse, et la Figure 17C se focalise sur les cellules qui expriment les gènes rapporteurs de manière forte ou moyenne (une lecture basse sensibilité). Toutefois, une autre analyse en augmentant la sensibilité des détecteurs des canaux FL1 et FL2 peut analyser et visualiser les cellules dont les niveaux fluorescents sont faibles (lecture haute sensibilité). Dans la plupart des cas l'analyse est limitée aux cellules « positives » d'une lecture basse sensibilité (Fig. 17). Ce sont les cellules visibles qui ne sont pas collées sur l'axe EGFP et dont l'activité du promoteur bidirectionnel est adaptée à l'analyse avec les réglages du cytomètre utilisée, pour ce faire un seuil est placé sur l'expression de la DsRed ($FL2 > 1$).

Les cellules HEK293 Tet-On expriment un niveau très faible de *let-7*, la présence de *let-7* endogène diminue légèrement l'expression d'EGFP par des constructions contenant des séquences cibles de ce miARN en l'absence de *let-7b* exogène. Cependant, vu que nous n'avons pas observé une variation du niveau du *let-7* endogène parmi la culture de cette

lignée, son effet ne sera pas pris en compte dans nos analyses si la situation de départ privée de régulation par *let-7* est définie par une transfection de la même construction indicatrice sans *let-7b* exogène.

B. Efficacité moyenne et spécificité du silencing

Dans une première approche j'ai étudié le silencing de l'expression de la construction pBiFluo-3milet7. Une séquence contenant 3 sites imparfaits pour *let-7* a été beaucoup utilisée comme modèle de régulation par les miARN. Si une séquence mutée du site de fixation est souvent utilisée comme contrôle, il n'existe pas de construction contrôle idéale puisque nous ne comprenons que partiellement les règles qui régissent l'interaction entre un miARN et sa cible. Dans cette première étude, j'ai utilisé comme contrôle la construction pBiFluo-i3milet7 dans laquelle la séquence contenant les trois sites de fixation pour *let-7* est intégrée en sens inverse. Si la spécificité d'intégration du brin guide est forte, cette construction contrôle ne devrait pas répondre à la présence de *let-7*. En fait, comme il apparaîtra au cours des travaux suivants, la question du contrôle n'est pas un problème majeur dans la mesure où les résultats ne sont que très faiblement modifiés par l'utilisation d'un autre contrôle (en général les variations sur les niveaux de fluorescence sont de l'ordre de 10%).

L'approche expérimentale utilisée reprend celle développée dans le laboratoire pour l'étude du silencing par les siARN. Elle consiste en une co-transfection de la construction indicatrice avec le petit ARN dans des cellules HeLa ou HEK 293 tet-on, l'expression de la construction étant induite 16 h après la transfection et analysé à 48 h post-transfection par la cytométrie. Les données peuvent être exploitées de plusieurs manières, l'une des plus simples étant de mesurer la valeur moyenne de la fluorescence. La Figure 18 montre les résultats obtenus pour le changement de la fluorescence moyenne de l'EGFP en présence d'1 nM de petit ARN. La fluorescence moyenne de la DsRed a été utilisée pour normaliser les expériences entre elles en tant que témoin du niveau d'expression de la construction indicatrice. Le niveau de la régulation est exprimé par la valeur d'expression relative d'EGFP. Cette valeur est calculée en utilisant les valeurs moyennes d'EGFP des cellules étudiées, par la formule suivante :

$$\text{Expression relative d'EGFP} = \text{EGFP}_R / \text{EGFP}_C * 100$$

EGFP_C signifie la valeur moyenne d'EGFP chez des cellules positives dans la situation où son expression n'est inhibée par aucun petit ARN régulateur (la valeur mesurée en présence d'un petit ARN irrelevant étant le plus souvent utilisée comme contrôle). EGFP_R est la valeur moyenne d'EGFP chez des cellules positives dans la situation où son expression est inhibée par le petit ARN régulateur. Toutes les valeurs d'EGFP sont normalisées par la valeur moyenne de DsRed de la même population cellulaire d'où elles sont extraites.

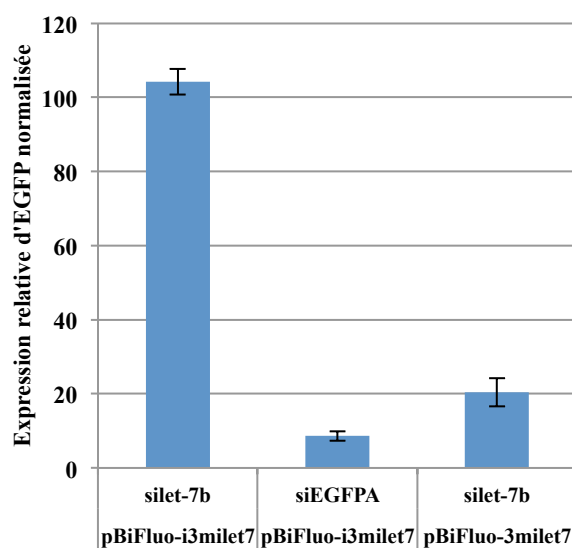


Figure 18, La réponse du système rapporteur au petit ARN est séquence spécifique. Le plasmide pBiFluo-i3milet7 comporte 3 séquences cibles pour silet-7b **en sens inverse** en aval de la région codante d'EGFP, il est co-transfecté avec 1 nM silet-7b ou 1 nM siEGFPA, qui cible la région codante d'EGFP, dans les cellules HEK293 Tet-On. Les mêmes expériences sont faites avec le plasmide pBiFluo-3milet7 portant 3 séquences cibles pour silet-7b à sens normal et 1 nM silet-7b. La figure montre l'expression relative d'EGFP par rapport à la situation contrôle avec un petit ARN irrelevant, les valeurs sont calculées à partir des valeurs moyennes

d'EGFP normalisées par la valeur de DsRed obtenues d'au moins 3 expériences séparées.

Pour la construction pBiFluo-3milet7, la diminution de la fluorescence moyenne verte est de 80 %, tandis que pour la construction pBiFluo-i3milet7 aucun changement significatif n'est observé (4 % +/- 3). Par contre la co-transfection avec un ARN interférant ciblant la région codante de l'EGFP (siEGFPA) induit un silencing de plus de 90 % de cette construction pBiFluo-i3milet7. De manière plus générale, l'ensemble des expériences que j'ai menées avec diverses constructions montre une excellente spécificité de la réponse, seules les constructions qui contiennent une ou plusieurs séquences cibles répondent de manière significative à la présence du petit ARN correspondant. Il est aussi important de noter que le fait d'introduire des séquences cibles ne modifie pas l'expression de la construction en l'absence du petit ARN. Aussi des résultats très voisins sont obtenus que l'on prenne comme contrôle la même séquence en l'absence de petit ARN ou une construction sans sites ou une construction avec des sites pour un autre petit ARN.

C. Dose-réponse et dose efficace 50

Le choix initial d'une concentration de petit ARN d'1 nM venait des résultats obtenus dans le laboratoire lors de l'étude du silencing sur une cible parfaitement complémentaire. La Figure 19A montre la dose réponse pBiFluo-silet7 à silet-7b.

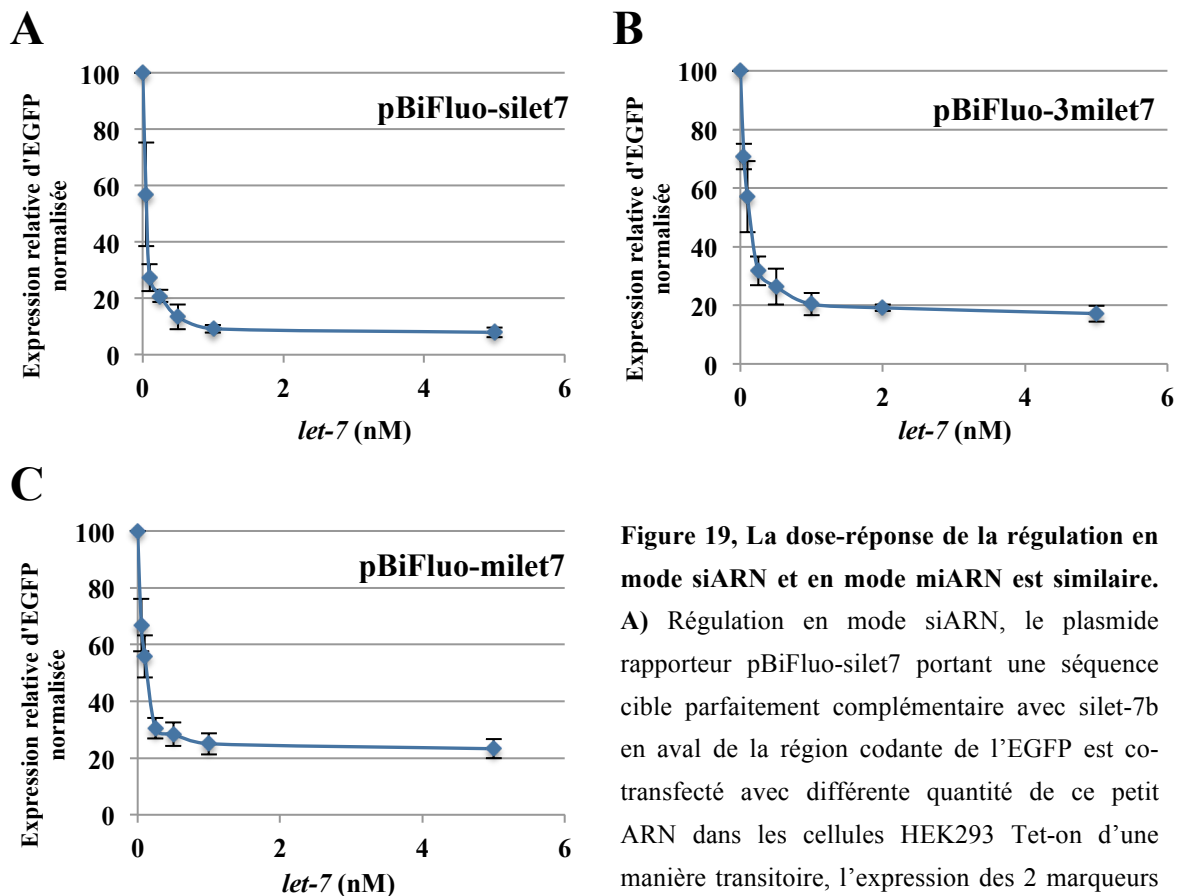


Figure 19, La dose-réponse de la régulation en mode siARN et en mode miARN est similaire.

A) Régulation en mode siARN, le plasmide rapporteur pBiFluo-silet7 portant une séquence cible parfaitement complémentaire avec silet-7b en aval de la région codante de l'EGFP est co-transfecté avec différente quantité de ce petit ARN dans les cellules HEK293 Tet-on d'une manière transitoire, l'expression des 2 marqueurs protéiques est mesurée par la cytométrie en flux

30 h après son induction par la Doxycycline, la valeur moyenne d'EGFP sont normalisée par celle de DsRed avant le calcul de son expression relative. La courbe illustre l'expression relative d'EGFP par rapport au contrôle sans silet-7b (Y) en fonction de la quantité de silet-7b ajouté dans le mélange de transfection (X). Les même expériences ont été réalisées avec **B)** Régulation en mode miARN, le plasmide pBiFluo-3milet7 portant 3 séquences cibles identiques partiellement complémentaires avec silet-7b en aval de la région codante de l'EGFP, **C)** Régulation en mode miARN, le plasmide pBiFluo-milet7 portant 1 séquence cible partiellement complémentaire avec silet-7b en aval de la région codante de l'EGFP. Chaque point constituant les courbes est calculé sur au moins 3 expériences séparées.

Dans toutes ces études la dose de petit ARN utilisée est en fait la dose mise à l'extérieur des cellules, qui est effectivement le paramètre contrôlé par l'expérimentateur, par contre on ne dispose pas d'information sur la dose qui pénètre réellement dans les cellules, la biodisponibilité de ces molécules et la possibilité qu'elles génèrent des complexes RISC

actifs. L'échelle des concentrations de petit ARN est donc utile pour comparer des activités biologiques mais ne peut pas être prise comme une échelle absolue. Le silencing atteint un plateau à 95 %, en d'autres termes l'expression résiduelle de la protéine EGFP est de 5 % par rapport au contrôle en l'absence de petit ARN. Ce niveau maximal de régulation est obtenu avec moins de 0,5 nM silet-7b dans la co-transfection. Quand le même petit ARN silet-7b est utilisé avec la construction pBiFluo-3milet7, le silencing maximal est de l'ordre de 80 % (Fig. 19B) et est atteint avec 1 nM silet-7b. Des résultats similaires sont obtenus avec les constructions pBiFluo-milet7 (Fig. 19C), même si l'efficacité maximale dépend du nombre de cibles ainsi que la concentration de petit ARN pour laquelle elle est atteinte.

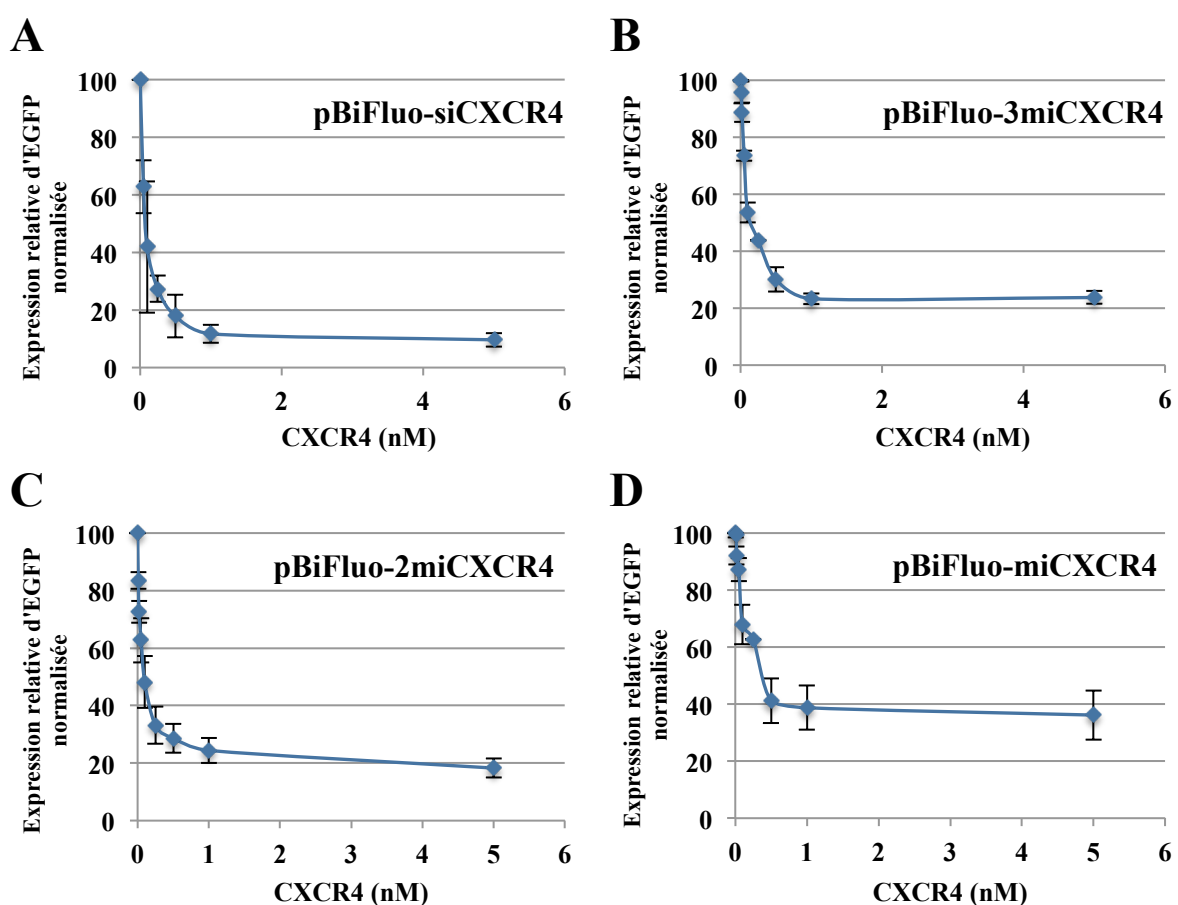


Figure 20, La dose-réponse en mode siARN et en mode miARN est similaire, cas de CXCR4. Les courbes dans cette figure sont obtenues en effectuant les mêmes expériences que celles décrites dans la **Figure 19** et présentées de la même manière, siCXCR4 est utilisé comme petit ARN régulateur. **A)** Régulation en mode siARN, le plasmide rapporteur pBiFluo-siCXCR4 qui comporte 1 séquence cible parfaitement complémentaire avec le petit ARN siCXCR4 en aval de la région codante d'EGFP est utilisé. **B), C) et D)** Régulation en mode miARN, le plasmide rapporteur pBiFluo-3miCXCR4, pBiFluo-2miCXCR4 et pBiFluo-miCXCR4 comprenant 3, 2 et 1 séquence(s) partiellement complémentaire(s) avec siCXCR4 en aval de la région codante d'EGFP est utilisé respectivement.

La même étude a été menée avec des constructions portant 1, 2 ou 3 sites imparfaits ou 1 site parfait pour le petit ARN CXCR4 (Fig. 20B, C, D et A respectivement). Ce modèle, qui est aussi souvent utilisé pour étudier la régulation par les miARN, a été développé par le laboratoire de P. Sharp (Doench et al. 2003). Il diffère du modèle *let-7* en ce qu'il n'existe pas de miARN CXCR4 naturel et que les sites imparfaits ont été créés pour démontrer que c'est bien la complémentarité entre le petit ARN et sa cible qui dicte le mode de régulation. Les courbes de dose-réponse sont similaires à celles observées avec *let-7*, le silencing maximal est de 90 % sur une cible parfaite, et varie entre 60 et 80 % en mode miARN en fonction du nombre de cibles. Dans la première description du modèle CXCR4 (Doench et al. 2003), il était indiqué que le silencing est coopératif, ce qui n'est pas immédiatement apparent sur ces courbes. Le plateau est atteint autour de 1 nM de petit ARN pour les différentes constructions.

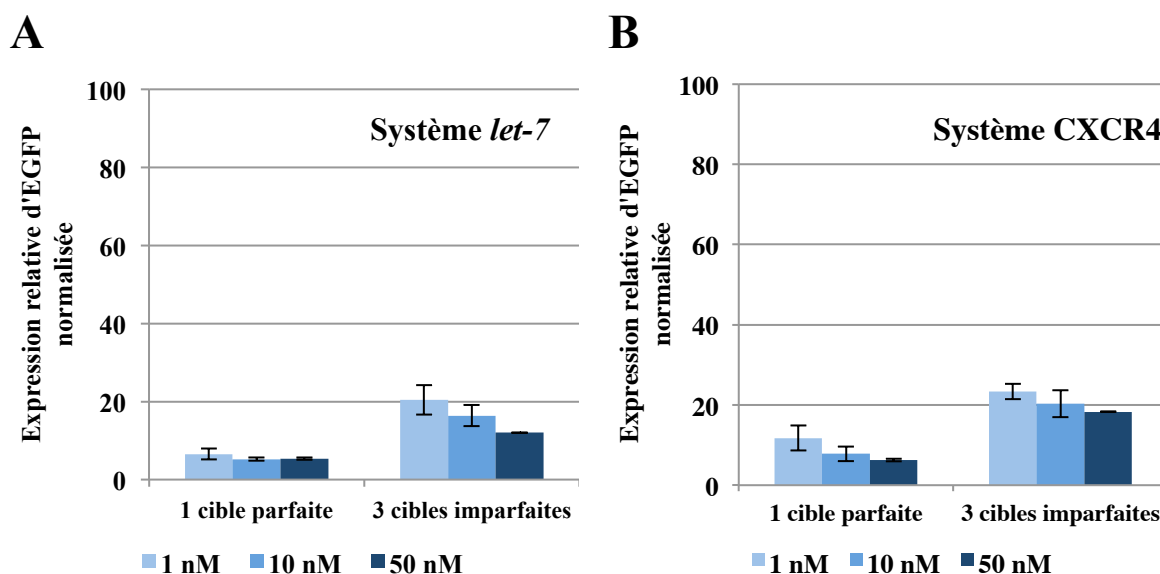


Figure 21, La régulation maximale en mode siARN et en mode miARN n'est pas modifiable par l'addition en excès de petit ARN. **A)** Le plasmide pBiFluo-silet7 (1 cible parfaite pour silet-7b) ou pBiFluo-3milet7 (3 cibles imparfaites pour silet-7b) est co-transfecté avec différentes doses de silet-7b dans les cellules HEK293 Tet-On comme indiqué. **B)** Le plasmide pBiFluo-siCXCR4 (1 cible parfaite pour le petit ARN siCXCR4) ou pBiFluo-3miCXCR4 (3 cibles imparfaites pour le petit ARN siCXCR4) est co-transfecté avec différentes doses de siCXCR4 dans les cellules HEK293 Tet-On comme indiqué. Le niveau de la régulation est calculé sur les valeurs moyennes d'EGFP normalisées d'au moins 3 expériences séparées.

Globalement, les constructions portant des sites pour *let-7* ou CXCR4 ont des réponses similaires à la co-transfection du petit ARN correspondant. En particulier, dans ces

premières études on peut observer qu'il n'existe pas de différence forte entre le silencing en mode siARN ou en mode miARN. Tout au plus le silencing maximal est plus faible sur les constructions avec des sites imparfaits. J'ai donc cherché à savoir si cette différence pouvait être éliminée avec des concentrations plus fortes de petit ARN. Les histogrammes de la Figure 21 montrent que même à une concentration 50 fois plus forte de petit ARN (50 nM) que celle nécessaire pour atteindre le plateau (1 nM), le silencing n'est pas modifié dans le de pBiFluo-3milet7 comme pBiFluo-3miCXCR4 (Fig. 21A et B respectivement). Une explication possible est que les complexes RISC disponibles sont tous chargés par les petits ARN introduits dans les cellules dès le début du plateau et qu'au-delà de cette dose les petits ARN ne sont pas incorporés dans les complexes RISC malgré leur présence dans les cellules. Une autre explication est que les méthodes de transfection que l'on pratique ne peuvent faire entrer qu'une certaine quantité de petits ARN dans les cellules et donc que la dose-réponse n'est pas complètement mise en œuvre.

Si on considère que la régulation d'une cible imparfaite n'induit pas la dégradation catalytique de l'ARNm comme dans le cas d'une cible parfaite, on s'attend à ce que l'efficacité du silencing soit bien plus différente. Toutefois il est possible que les expériences présentées aient été réalisées dans des conditions saturantes de petit ARN auquel cas la différence ne serait plus perceptible. Pour préciser ce point j'ai mesuré avec une plus grande précision que dans les expériences précédentes la dose efficace 50 nécessaire pour le silencing en mode siARN ou miARN (Fig. 22). D'après les courbes de dose-réponse, les doses efficace 50 des régulations en mode siARN induites par ces deux petits ARN (silet-7b et siCXCR4) sont de l'ordre de 50 pM (Fig. 22A et B) ; dans le cas des régulations en mode miARN, les doses efficace 50 varient peu en fonction des combinaisons cible/petit ARN, et se situent entre 50 pM et 100 pM (Fig. 22 C, D, E et F), et ne sont que peu affectées par le nombre de séquences cibles présentes sur l'ARNm. La différence de la dose efficace 50 entre la régulation en mode miARN et en mode siARN est donc au plus de l'ordre d'un facteur deux. La similarité de ces deux paramètres mesurant l'efficacité d'une régulation — le niveau maximal de la régulation et la dose efficace 50 de l'inducteur de la régulation — nous indique que la régulation en mode miARN est presque aussi efficace que la régulation en mode siARN. Ces premières observations, qui sont en contradiction avec les données publiées par les autres équipes indiquant que le silencing en mode siARN est nettement plus efficace (A. L. Jackson et al. 2003; Mullokandov et al.

2012), suggèrent que la régulation en mode miARN fonctionne aussi sur un mode catalytique, sans toutefois le démontrer.

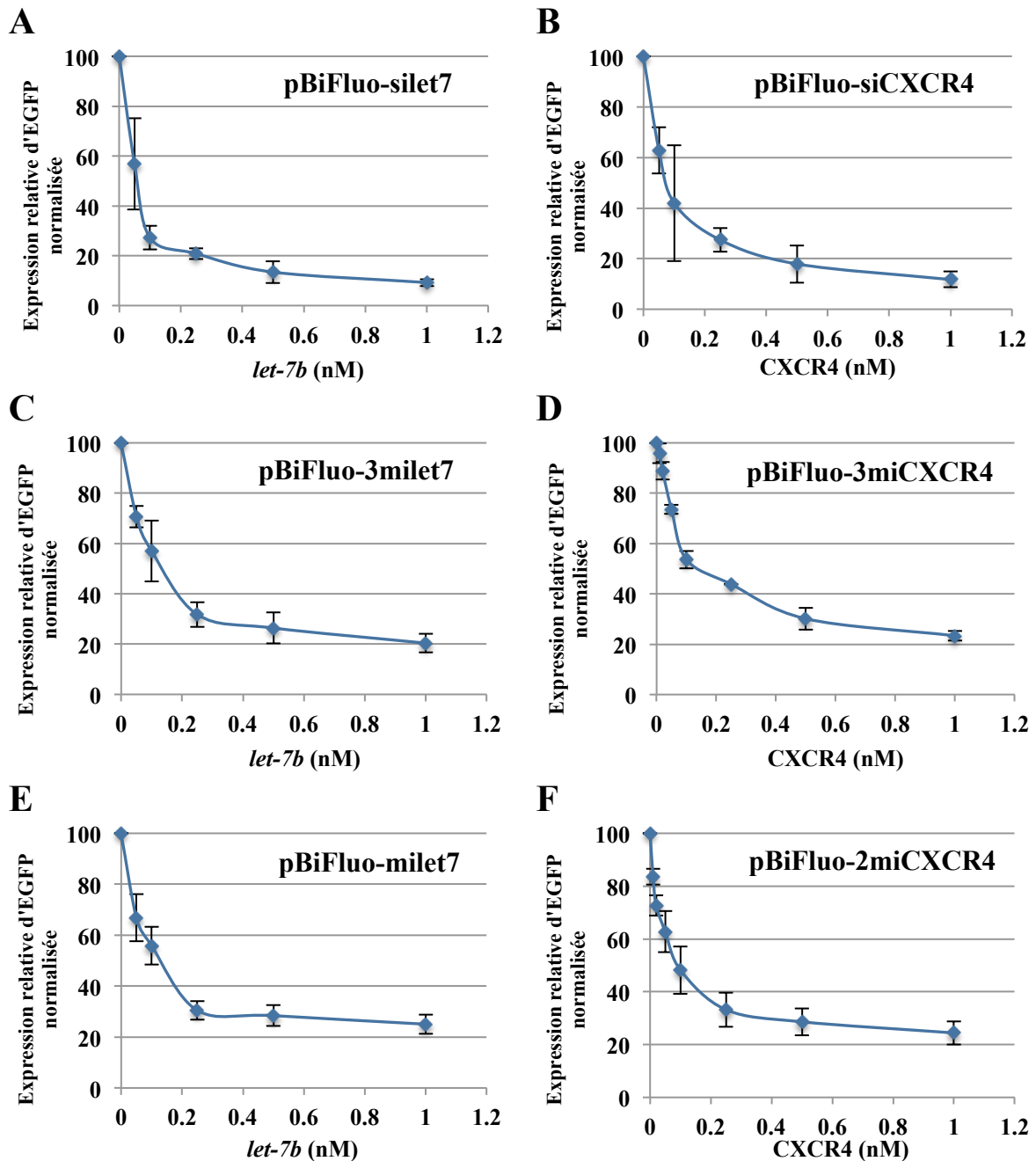


Figure 22, La dose efficace 50 de petit ARN régulateur est comparable pour la régulation en mode siARN et la régulation en mode miARN. A) et B) Régulation en mode siARN, le plasmide pBiFluo-silet7 ou pBiFluo-siCXCR4 est co-transfecté avec différentes doses de petit ARN régulateur approprié (silet-7b ou siCXCR4) dans les cellules HEK293 Tet-On respectivement, le niveau de la régulation induite par le petit ARN est mesuré de la même manière que dans la **Figure 18. C) et D) Régulation en mode miARN, les mêmes expériences sont faites avec le plasmide pBiFluo-3milet7 ou pBiFluo-3miCXCR4 respectivement. E) et F) Régulation en mode miARN. Les mêmes expériences sont faites avec le plasmide pBiFluo-milet7 ou pBiFluo-2miCXCR4 respectivement. Chaque point constituant les courbes est calculé sur au moins 3 expériences séparées.**

D. L'efficacité de la régulation par les miARN est pratiquement indépendante du niveau d'expression du gène cible

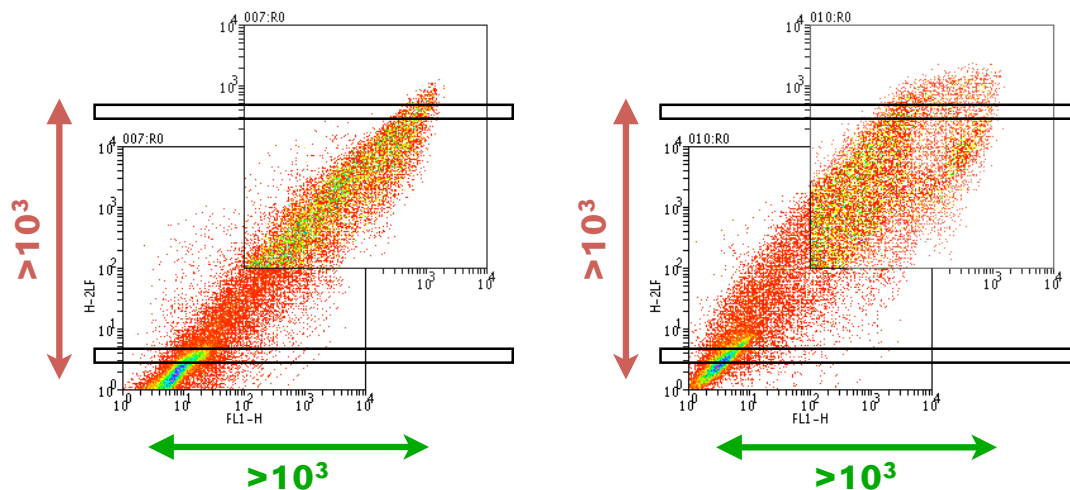
Par définition, un processus catalytique est capable de prendre en charge plusieurs molécules de substrat pour chaque effecteur, la vitesse de recyclage du complexe contrôlant l'efficacité de la catalyse. En régime stationnaire, l'efficacité d'un processus catalytique est peu dépendante de la quantité initiale de substrat si le catalyseur est en excès ou a un recyclage rapide. Afin de vérifier si le mécanisme du silencing sur une cible imparfaite est vraiment catalytique, j'ai analysé la relation entre le niveau d'expression du gène cible (la quantité du substrat de la réaction) et l'efficacité de la régulation. En effet, dans les expériences de transfection transitoire utilisant nos constructions indicatrices, les niveaux d'expression des deux protéines fluorescentes dans chaque cellule sont corrélés, mais l'intensité des 2 fluorescences varie considérablement entre cellules. De fait, les intensités diffèrent de plus de quatre ordres de grandeur entre les cellules les plus et les moins fluorescentes. Plusieurs facteurs peuvent intervenir dans cette variation : la quantité de plasmide reçu par chaque cellule, le niveau d'expression du transactivateur rtTA et en conséquence la transcription de la construction, l'état physiologique de la cellule qui peut jouer sur la traduction des ARN messagers, l'efficacité du repliement des protéines et leur stabilité. Dans notre approche, la cytométrie en flux permet la mesure du niveau d'EGFP et de DsRed dans chaque cellule, il est donc possible de déterminer l'efficacité de la régulation dans des sous-populations cellulaires dont le niveau d'expression du plasmide est différent en faisant une sélection en fonction de l'intensité de DsRed. Comme montré dans la Figure 23A, une série de fenêtres le long de l'axe DsRed permet d'analyser le silencing en fonction du niveau d'expression de la construction indicatrice. La validité de cette approche, qui suppose que l'expression de la DsRed soit un indicateur de l'activité du promoteur et ne soit pas affectée par le silencing de l'EGFP, sera abordée dans la discussion.

RESULTATS

Etude comparative siARN et miARN

Régulation par miARN et expression du gène cible

A



B

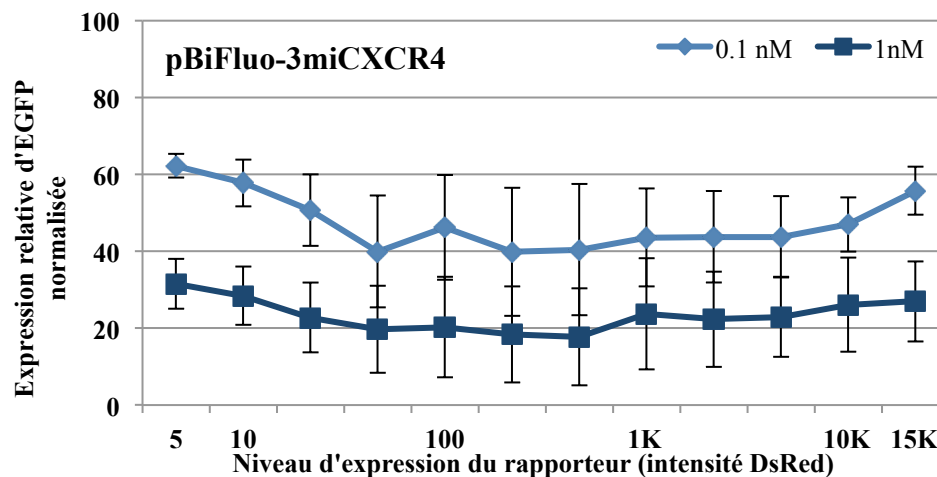
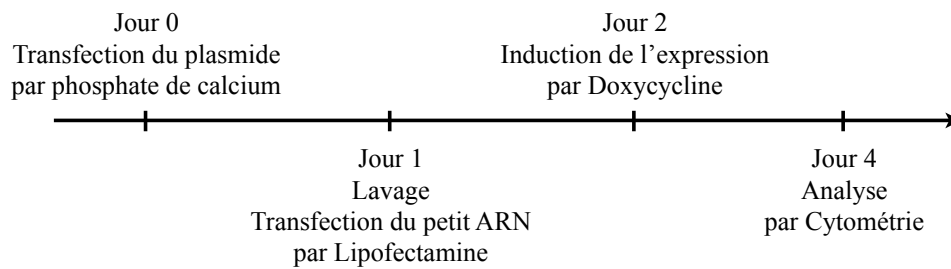


Figure 23, Le niveau de la régulation en mode miARN reste stable malgré l'augmentation de l'expression du gène cible dans des expériences de co-transfection. A) Le plasmide rapporteur et le petit ARN régulateur approprié sont co-transfectés dans les cellules HEK293 Tet-On, 30 h après l'induction de l'expression du plasmide, les cellules sont analysées par la cytométrie en flux. 2 acquisitions de données sont faites sur le même échantillon cellulaire avec 2 jeux de réglages différents au niveau de la sensibilité des détecteurs du canal FL1 (vert) et du canal FL2 (rouge). Une acquisition se focalise sur les cellules qui expriment faiblement les 2 protéines rapporteuses (dot-plot en bas) tandis que l'autre optimise la détection des cellules qui les expriment fortement (dot-plot en haute). La fusion des 2 jeux de données ainsi obtenus est fondée sur la proportion de cellules dont la valeur EGFP ou DsRed est inférieure à 1 dans une acquisition optimale pour les cellules hautement fluorescentes. Les différentes sous-populations sont sélectionnées en fonction de leur valeur DsRed, cadrées par les rectangles. **B)** Le niveau de régulation au sein d'une sous-population est ensuite calculé par comparaison des valeurs moyennes d'EGFP entre les situations sans et avec petit ARN régulateur. Le niveau de l'expression globale des sous-populations cellulaires est illustré par leur intensité de DsRed (X), l'efficacité de la régulation en mode miARN correspondante est démontrée en tant que l'expression relative d'EGFP par rapport au contrôle sans petit ARN régulateur (Y). La régulation en mode miARN en présence de 2 différentes doses de petit ARN régulateur est montrée, 0.1 nM (bleu clair) et 1 nM (bleu foncé) transfecté. Chaque point constituant les courbes est calculé sur 5 expériences individuelles.

Afin d'exploiter tous les niveaux d'expression, deux acquisitions ont été faites pour les mêmes échantillons en réglant les détecteurs du cytomètre à différentes sensibilités (Fig. 23A). Les résultats des expériences de co-transfection plasmide/petit ARN montrent que l'efficacité de la régulation sur une cible imparfaite change peu lorsque le niveau d'expression du rapporteur augmente 3 000 fois. De plus, ceci est vrai même pour une faible dose de petit ARN, qui ne conduit qu'à un silencing partiel (0.1 nM, 50 à 70 % de l'efficacité maximale, Fig. 23B). D'après l'ANOVA (Analysis of Variance), la variation du taux du silencing au différent niveau d'expression du plasmide n'est pas significative : pour le cas de 0.1 nM CXCR4, la valeur F est 2.08, inférieure à F_{crit} (F critical) qui est 2.36 ; pour celui d'1 nM CXCR4, la valeur F est inférieure à 1. L'absence d'une saturation de la régulation en présence d'une forte quantité de substrat et ce, même à faible dose d'effecteur, suggère que les complexes RISC agissent de manière catalytique même sur une cible imparfaite.

Une limitation importante des expériences précédentes vient de l'utilisation d'une co-transfection. En effet, il est probable que les quantités de plasmide et de petit ARN introduites dans une cellule soient corrélées, et donc que les cellules qui ont la plus forte fluorescence aient aussi reçu les doses les plus fortes de petit ARN. Afin d'exclure ce biais éventuel, des expériences de double-transfection ont été faites. Dans une telle expérience, la transfection du plasmide et la transfection du petit ARN régulateur sont faites séparément au cours du temps (Fig. 24A). De plus, les deux transfections sont réalisées par des méthodes différentes, phosphate de calcium pour la première et lipofectamine pour la deuxième, minimisant la possibilité d'une corrélation entre la transfection du plasmide et celle du petit ARN. Les résultats obtenus par les double-transfections (Fig. 24B) sont très voisins de ceux obtenus précédemment (Fig. 23B) : l'efficacité du silencing change peu en fonction du niveau d'expression du gène cible. L'amplitude des différences d'expression est la même que précédemment (3 000x) et de nouveau la même observation est vraie à 2 doses différentes de petit ARN transfecté (10 nM ou 0.1 nM). De même, ces observations sont validées par une ANOVA qui indique que la variation du silencing en fonction du niveau d'expression du plasmide n'est pas significative : pour 0.1 nM CXCR4, F (2.27) < F_{crit} (2.47) ; pour 1 nM CXCR4, F < 1.

A



B

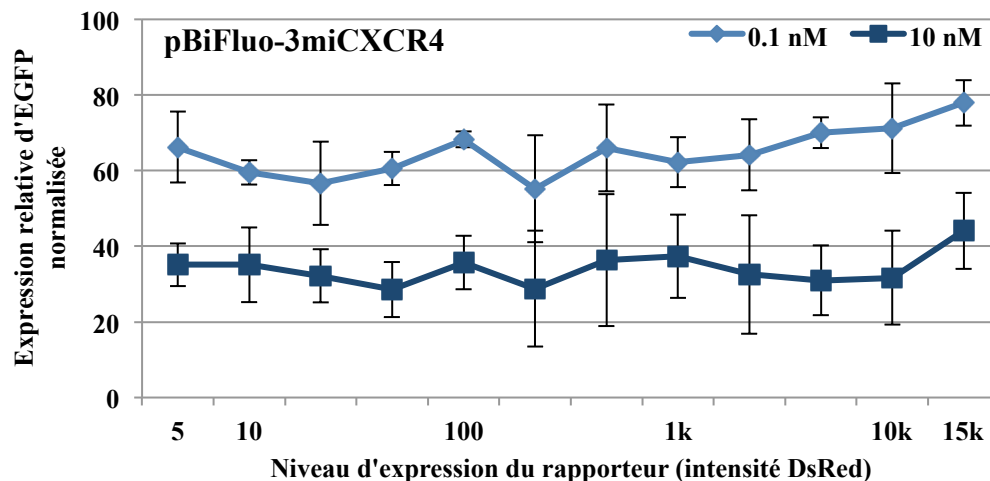


Figure 24, Le niveau de la régulation en mode miARN reste stable malgré l'augmentation de l'expression du gène cible dans des expériences de double transfection. A) Schéma de l'expérience double-transfection. B) Les cellules HEK293 Tet-On ainsi transfectées sont analysées en suivant la même méthode que dans la Figure 23B. Le niveau d'expression globale du plasmide est indiqué par l'intensité de DsRed (X), l'efficacité de la régulation en mode miARN de chaque niveau d'expression est illustré par l'expression relative d'EGFP par rapport au contrôle sans petit ARN régulateur (Y). Montré dans la figure est la régulation en mode miARN en présence de 2 doses différentes de petit ARN, 0.1 nM (bleu clair) et 10 nM (bleu foncé). Chaque point constituant des courbes est calculé à partir de 4 expériences individuelles.

L'ensemble de ces observations montre une absence de saturation de la régulation sur une cible imparfaite, même pour des niveaux très élevés d'expression du gène cible. Ceci n'est pas compatible avec un mode d'action stœchiométrique et la similarité de la réponse observée avec celle sur une cible parfaite renforce l'argument en faveur d'un mode d'action catalytique. De fait, l'idée d'une action stœchiométrique vient des observations initiales chez *C. elegans* en faveur d'une régulation de la traduction, sans modification de la quantité d'ARNm. Dans ce cas le schéma le plus simple est que l'association du complexe RISC avec la région 3' non traduite de l'ARNm cible aurait un effet inhibiteur sur la traduction - du moins tant que le complexe est présent sur l'ARNm cible. Mais, dans

les cellules de mammifère en culture, il n'a pas été mis en évidence de population d'ARN messagers bloqués dans leur traduction mais une déstabilisation des ARNm cibles est souvent observée. Dans ce cas, la fixation du complexe RISC sur une cible imparfaite pourrait « activer » la dégradation de l'ARNm, ce qui pourrait conduire au recyclage de RISC. Ainsi, pour une cible imparfaite, les RISC réussiraient à « catalyser » une dégradation de la cible indépendamment de l'activité endonucléolytique des protéines Ago.

Cette hypothèse est soutenue par nos observations faites avec 0.1 nM de petit ARN, où la régulation n'atteint pas son niveau maximal, indiquant que la quantité des RISC actifs ne sont même pas capables de s'occuper de toutes les molécules d'ARNm, toutefois, quand l'abondance des molécules d'ARNm augmente, cette petite réserve des complexes RISC a plus de chance de rencontrer ses cibles. Grâce à la rapidité de l'induction de la dégradation de leurs cibles et le recyclage du complexe, ils détruisent les ARNm cible à une vitesse relativement stable. La constante de recyclage des complexes RISC (K_{rc}) est le facteur déterminant du niveau de la régulation en mode miARN pour une quantité donnée de complexe présente au sein d'une cellule, ainsi l'efficacité de la régulation en mode miARN n'est pas modifiée en fonction du niveau de l'expression du gène cible dans notre système rapporteur.

Cependant, il faut noter que des données récemment publiées par l'équipe de van Oudenaarden, qui utilise une approche très similaire à la nôtre permettant d'évaluer le niveau du silencing dans des cellules individuelles, soulignent qu'une fois le niveau d'expression du gène cible dépasse un seuil, le silencing en mode miARN devient très sensible à la quantité de l'ARNm cible (Mukherji et al. 2011). Le mode d'action du silencing en mode miARN dépendait probablement des conditions d'observation.

E. Les miARN induisent la dégradation des ARNm cible

Nos études sur la régulation au niveau de l'expression des protéines rapporteuses montrent clairement que l'efficacité de la régulation en mode miARN est « comparable » avec celle de la régulation en mode siARN, les analyses portant sur l'impact de l'expression du gène cible à la force du silencing en mode miARN soulignent que les petits ARN partiellement complémentaires avec leur cible peuvent s'occuper efficacement d'un grand nombre de molécules cibles, ce qui nous conduit à contrôler le niveau de l'ARNm cible afin de vérifier s'ils sont d'avantage dégradés par ces petits ARN.

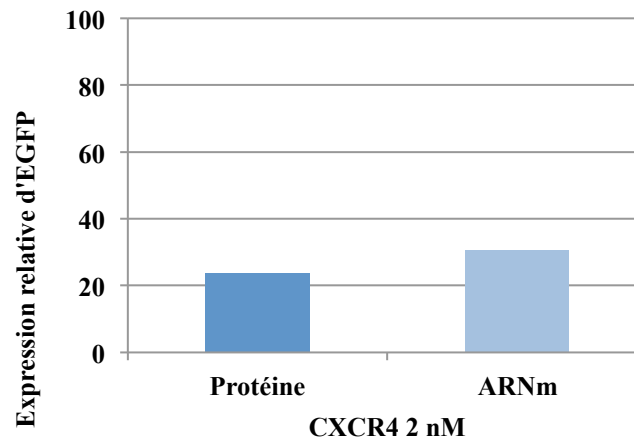


Figure 25, La régulation en mode miARN diminue le niveau d'ARNm d'EGFP. Le plasmide pBiFuo-2CXCR4 et le petit ARN siCXCR4 sont co-transfectés dans les cellules HEK293 Tet-On, l'expression des 2 protéines fluorescentes est induite, 24 h après l'induction, les cellules sont collectées. Un quart des cellules ainsi récupérées sont analysées par la cytométrie en flux pour investiguer l'altération du niveau protéique causée par la présence de siCXCR4 ; le reste des cellules sont adressées à un extraire immédiat de l'ARN total par le kit SV total RNA isolation system de Promega (ou par le traitement à la thiocyanate et l'ultracentrifugation dans le gradient CsCl), l'ARN total est ensuite analysé par la qRT-PCR en utilisant des primers amplifiant un fragment situé dans la région codante d'EGFP. Le calcul du niveau régulateur de la protéine d'EGFP suit la méthode décrite auparavant, la détermination du niveau régulateur de l'ARNm d'EGFP est établie par une comparaison du nombre de cycle d'amplification entre un échantillon soumis à la régulation en mode miARN et celui de contrôle sans régulation en place. Les données de qRT-PCR sont normalisées par le cycle d'amplification d'un fragment de l'ARNm de GADPH au sein de la même préparation d'ARN total.

Les ARN totaux extraits sur l'ensemble des cellules transfectés par le plasmide et le petit ARN régulateur sont analysés par qRT-PCR amplifiant un fragment de la région codante d'EGFP pour déterminer la diminution de son ARNm induite par la régulation en mode miARN. Le niveau de la régulation protéique de la même préparation cellulaire est contrôlé parallèlement par la cytométrie en flux afin de comparer l'efficacité de la régulation à ces 2 horizons. Les résultats nous confirment que l'abondance de l'ARNm d'EGFP exprimé par le plasmide pBiFuo-2CXCR4 est considérablement altérée par siCXCR4 induisant la régulation en mode miARN (Fig. 25). Nous constatons également que la diminution de l'ARNm d'EGFP et celle de son niveau protéique sont corrélées (Fig. 25), cela suggère que le facteur majeur de la baisse de l'intensité moyenne d'EGFP au sein d'une population cellulaire est la dégradation de son ARNm durant le silencing en mode miARN. Cette observation favorise la proposition évoquée auparavant : dans notre système expérimental, durant le silencing en mode miARN, les complexes RISC actifs pourraient

induire une dégradation catalytique de l'ARNm cible comme dans la régulation en mode siARN, mais via une voie distincte, c'est pour cette raison que leur efficacité est comparable.

Les techniques que nous possédons ne nous permettent pas d'analyser le changement de la quantité d'ARNm cible aux différents niveaux d'expression du plasmide comme ce qui a été fait pour mesurer la régulation protéique, toutefois, en combinant nos observations et les données publiées par les autres équipes (Beilharz et al. 2009; Braun et al. 2011; Chekulaeva et al. 2011; C. Chen et al. 2009; Eulalio, Huntzinger, et al. 2009b; Fabian et al. 2011; Piao et al. 2010), nous proposons que la régulation en mode miARN réduirait considérablement la demie vie des ARNm ciblés par la déadénylation, l'induction de la déadénylation par les complexes RISC serait rapide, une fois activée, la molécule d'ARNm poursuivrait sa dégradation sans la présence du complexe RISC, leur taux de recyclage serait alors suffisamment élevé pour qu'une petite réserve des complexes RISC puissent prendre en charge un grand nombre de molécules cibles.

Chapitre II. Variabilité de la régulation en mode miARN au sein de la population cellulaire

Comme évoqué auparavant, notre système expérimental permet de mesurer le niveau d'expression des protéines fluorescentes dans chaque cellule ce qui donne accès à un très grand nombre d'informations. De fait, l'exploitation des données présuppose que l'on ait défini la nature de la question étudiée et donc que l'on choisisse une méthode d'analyse adaptée. Les résultats montrés dans le chapitre précédent ont été déduits des valeurs moyennes de fluorescence sur l'ensemble des cellules ou une sous-population cellulaire définie par des critères simples. Aussi dans ces analyses l'approche est-elle en fait voisine de celle qui est possible avec les constructions classiques de type luciférase, sauf en ce qui concerne l'impact du niveau d'expression du gène cible. Dans ce chapitre, nous allons analyser ces données d'une manière plus détaillée afin d'exploiter des informations qui ne sont pas accessibles par l'approche habituelle et ainsi compléter notre compréhension de la régulation par les miARN sur des cibles imparfaites

Les résultats présentés dans le chapitre précédent montrent une régulation sur les cibles imparfaites qui est proche de celle observée sur des cibles parfaites, par exemple en terme de dose efficace 50, mais avec néanmoins une efficacité légèrement moindre (en terme de silencing maximal). Cette similarité est particulièrement vraie dans le cas de sites imparfaits multiples présents dans la région 3' non codante du gène cible (EGFP), mais reste perceptible sur une cible imparfaite unique.

Dans une hypothèse simpliste où l'on suppose que l'effet de la régulation sur les cibles imparfaites reflète uniquement la dégradation de l'ARNm cible via la déadénylation (et donc qu'il n'existe pas à l'équilibre de population purement régulée au niveau de la traduction), ce mécanisme dépend de deux facteurs principaux : d'une part la constante d'association du petit ARN sur sa cible et d'autre part la vitesse de la déadénylation. Plus l'hybridation petit ARN/cible est stable, plus les conditions sont favorables pour les réactions suivantes. La stabilité de l'interaction du complexe RISC est à priori plus grande sur une cible parfaite que sur une cible imparfaite. Sur la base de cette étape on peut donc s'attendre à ce que le silencing en mode siARN soit plus efficace (la présence de plusieurs cibles imparfaites sur l'ARNm cible pourrait augmenter la stabilité d'interaction

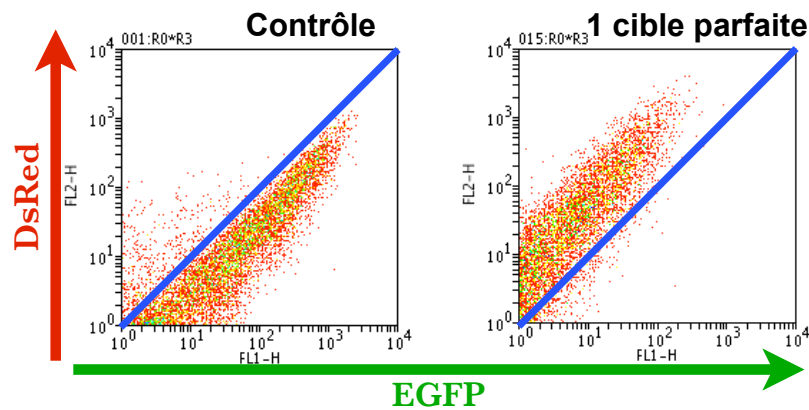
RISC/cible, en conséquence augmenter l'efficacité de la régulation). En ce qui concerne la dégradation de l'ARN, on ne dispose pas de données suffisantes pour comparer la cinétique de la coupure endonucléolytique et celle de la déadénylation puis du décoiffage. Une vision simpliste de ces processus tend à suggérer que la déadénylation puis le décoiffage pourraient être plus lents que la coupure du fait du plus grand nombre de partenaires impliqués. Par contre, dès que des extrémités libres d'ARN sont exposées elles devraient être rapidement dégradées par les exonucléases 5' et 3' présentes dans la cellule. Comme il est proposé que, pour les régulations sur une cible parfaite ou imparfaite, la dégradation ait lieu dans les P-bodies (Peters & Meister 2007) où les différents éléments du catabolisme des ARNm sont concentrés, l'environnement serait identique dans les deux cas. La vitesse de dégradation des ARNm ne devrait donc pas être notablement différente pour les deux types de régulation dès lors qu'ils ont été déprotégés. La situation réelle est plus compliquée non seulement à cause de l'existence éventuelle d'une régulation purement au niveau de la traduction de l'ARNm, mais aussi du fait des nombreuses protéines qui semblent impliquées dans la régulation sur une cible imparfaite et pourraient intervenir dans son efficacité. Les analyses des données en regardant uniquement le changement des valeurs moyennes des gènes rapporteurs ne sont informatives que dans la mesure où le silencing est homogène et affecte de la même manière toutes les cellules. Cette partie étudie la validité d'une telle hypothèse.

I. Analyse des données de cytométrie : nuages de points et histogrammes

Lorsque seulement deux paramètres sont étudiés, la présentation en nuage de points permet de visualiser l'ensemble des données sous une forme rapidement exploitable. Les histogrammes, par contre, en fournissant des données quantitatives sur un seul paramètre permettent de focaliser l'analyse. Dans toutes les analyses qui sont présentées ici, une sélection préalable des données a été effectuée sur la base du profil de diffusion. Ce point est discuté dans les matériels et méthodes et permet de restreindre l'analyse aux cellules qui sont intactes sur la base de leur taille et de leur granulosité de surface. Si cette sélection est en partie arbitraire, les conclusions ne dépendent jamais du détail de cette sélection et sont souvent visibles au niveau de la population totale même si la présence de groupes de cellules (doublets, triplets) rend souvent l'image plus complexe. La Figure 26A présente le

nuage de points correspondant à une situation de contrôle, des cellules HEK293 Tet-on transfectées par le plasmide rapporteur pBiFluo-siCXCR4 (1 séquence cible parfaitement complémentaire avec le petit ARN siCXCR4) en absence de petit ARN régulateur.

A



B

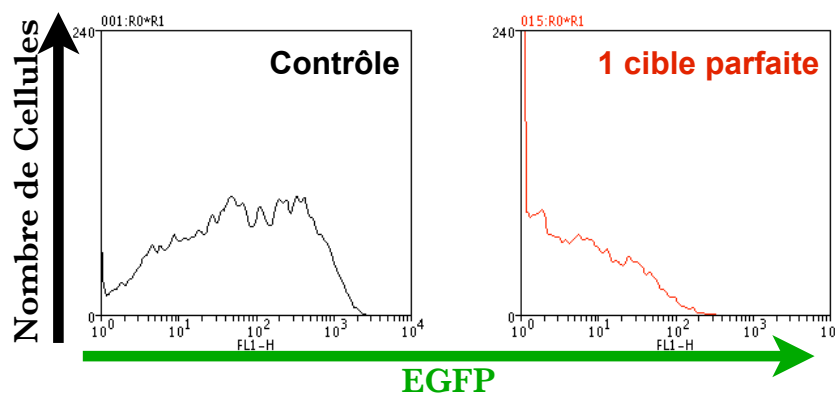


Figure 26, Présentation de méthodes d'analyse. A) Les données présentées en dot-plot. Les cellules HEK293 Tet-On sont transfectées par pBiFluo-siCXCR4 avec 2 nM petit ARN contrôle (dot-plot de gauche) ou avec 2 nM de petit ARN siCXCR4 (dot-plot de droite), les échantillons sont analysés par la cytométrie en flux 30 h après l'induction de l'expression des gènes rapporteurs. Le cytomètre est réglé avec le même jeu de réglages de la sensibilité de détecteurs dans les 2 analyses. Ce jeu de réglage permet d'optimiser la détection des cellules exprimant les 2 protéines fluorescentes à haut niveau. L'axe FL1-H et FL2-H représentent respectivement l'intensité d'EGFP et de DsRed. Dans ces 2 dot-plots, les points dont la valeur FL2-H est 1 sont exclus. **B)** Les mêmes données sont présentées en histogramme. Ces histogrammes montrent la distribution des cellules en fonction de leur valeur FL1-H. Les cellules dont la valeur FL2-H est 1 sont exclues.

Le nuage de points se positionne le long de la diagonale du diagramme ce qui montre que l'expression des deux gènes rapporteurs EGFP et DsRed est corrélée. Un changement du niveau d'expression de l'un des gènes rapporteurs est reflété par un décalage de position du

nuage de points selon l'axe correspondant. Comme montré dans Figure 26A, le nuage de points de droite représente l'expression des gènes rapporteurs en présence du petit ARN siCXCR4 (régulation en mode siARN). On peut facilement constater que le nuage de points est décalé vers la gauche par rapport au contrôle, ce qui indique une diminution de l'expression de l'EGFP comme on peut l'attendre du fait de l'action du petit ARN.

La Figure 26B montre les mêmes données sous forme d'histogramme pour la valeur de FL1-H. La même échelle logarithmique (1 -10 000) que pour le nuage de point est utilisée pour l'histogramme. Dans le cas de contrôle (Fig. 26B, gauche), la courbe noire montre que les cellules se distribuent sur des valeurs de FL1 comprises entre 0 et 3000, avec une plus grande abondance entre 10 et 1000, tandis que très peu de cellules ont une valeur FL1-H = 1 (la valeur minimale dans cette mesure). Le profil est profondément modifié en présence du petit ARN siCXCR4 (Fig. 26B, droite) : la courbe rouge montre qu'aucune cellule n'exprime l'EGFP à un niveau supérieur à 400, la majorité des cellules l'exprimant à un niveau inférieur à 10 avec un grand nombre de cellules sur le point FL1-H = 1.

Chaque présentation est adaptée à l'analyse d'un aspect particulier des données. Les nuages de points permettent d'apprécier visuellement l'expression au sein de l'ensemble des cellules et ainsi de juger de sa régulation. Ici, il apparaît que bien que les niveaux d'expression varient considérablement entre cellules, l'expression de l'EGFP et celle de la DsRed sont corrélées. De plus, cette vision en deux dimensions permet d'identifier des sous-populations même si elles ne concernent que très peu de cellules. Par contre, cette représentation ne fournit pas directement de données chiffrées à moins d'extraire les valeurs moyennes de fluorescence pour une sous-population particulière. Les histogrammes fournissent une représentation intermédiaire plus riche en information quantitative mais qui traite chaque paramètre individuellement. Ici, l'accumulation des cellules en FL1-H = 1 après silencing est directement représentée sur l'histogramme (Fig. 26B, droite) mais n'est pas visible sur le nuage de points (Fig. 26A, droite) même si on peut supposer que les cellules sont collées sur l'axe FL2-H. La possibilité de focaliser l'analyse sur une partie des données permet d'exploiter la grande quantité d'informations contenues dans les analyses de cytométrie dès lors que l'on a choisi l'aspect que l'on veut étudier.

II. Hétérogénéité de la régulation par les miARN chez les cellules HEK293 Tet-On

A. Mise en évidence de cellules dans lesquelles l'expression du gène cible n'est pas affectée par le silencing en mode miARN

La Figure 27 illustre les possibilités d'analyse des données de cytométrie dans le cas du silencing en mode siARN et en mode miARN. Les nuages de points sont présentés en Figure 27C pour une transfection contrôle (pBiFluo-siCXCR4) et les constructions pBiFluo-siCXCR4 et pBiFluo-3miCXCR4 co-transfectées avec 2 nM de petit ARN CXCR4. Seule une lecture à faible sensibilité est présentée ici, ce qui permet d'étudier les cellules avec un niveau d'expression du plasmide transfecté de moyen à fort. Pour faciliter la perception visuelle de la répartition des cellules sur l'ensemble de la figure, la position des cellules dans le contrôle est marquée par un polygone noir. En fait cette région ne comprend pas toutes les cellules du contrôle mais uniquement la région de plus forte densité (comme indiqué sur la figure cette région correspond à ~ 89% des cellules).

Une première analyse des données est présentée sur la Figure 27A, elle porte sur la valeur moyenne de la fluorescence de l'EGFP dans les trois échantillons en utilisant une sélection sur le niveau de DsRed >1 (cellules positives), de manière à ce que seules les cellules visibles sur le nuage de point soient prises en compte dans la valeur moyenne. Le niveau de la régulation est exprimé par la valeur d'expression relative d'EGFP. Cette valeur est calculée en utilisant les valeurs moyennes d'EGFP des cellules étudiées, par la formule que précédemment :

$$\text{Expression relative d'EGFP} = EGFP_R / EGFP_C * 100$$

$EGFP_C$ signifie la valeur moyenne d'EGFP chez des cellules positives dans la situation où son expression n'est inhibée par aucun petit ARN régulateur tandis que $EGFP_R$ est la même valeur dans la situation où l'expression d'EGFP est inhibée par le petit ARN régulateur, dans ce cas siCXCR4. Toutes ces valeurs d'EGFP sont normalisées par la valeur moyenne de DsRed de la même population cellulaire d'où elles sont extraites.

RESULTATS

Variabilité de la régulation par les miARN

Hétérogénéité du silencing miARN : Lignée HEK293 Tet-On

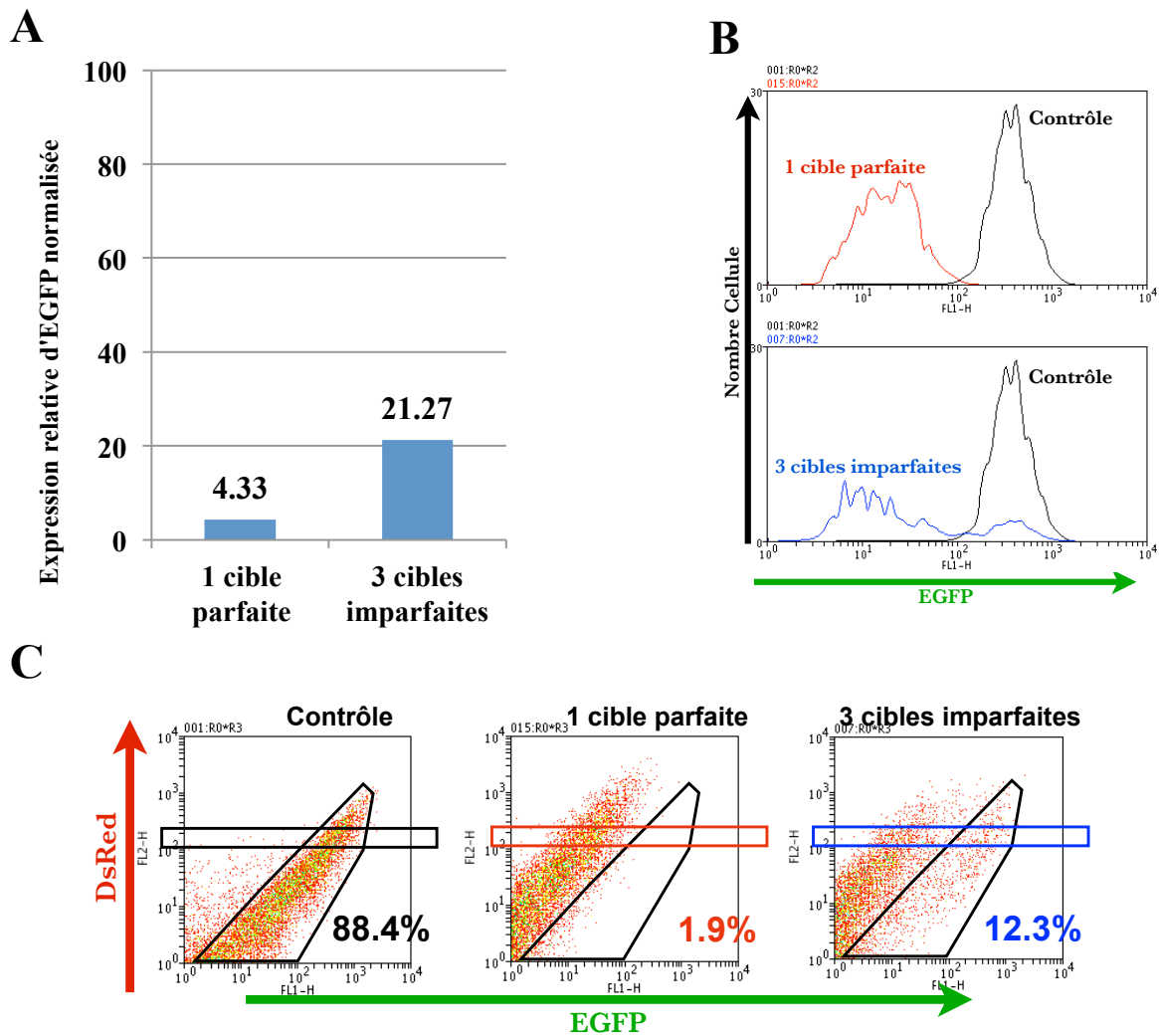


Figure 27, La régulation en mode miARN n'est pas homogène parmi toutes les cellules.

A) Le pBiFluo-siCXCR4 est transfecté sans (contrôle) ou avec 2 nM de siCXCR4 (1 cible parfaite) dans les cellules HEK293 Tet-On, pBiFluo-3CXCR4 est transfecté avec la même dose de siCXCR4 (3 cibles imparfaite). Le niveau de la régulation est calculé en utilisant les valeurs moyennes d'EGFP normalisées chez les cellules positives dans un jeu de données appuyant les cellules « forts expresseurs ». L'expression relative d'EGFP normalisée par rapport au contrôle sans petit ARN régulateur est indiquée. **B)** Les histogrammes de la distribution des cellules en fonction de leur intensité d'EGFP. Montrées sont des cellules sélectionnées par les rectangles dans les dot-plots de figure C. La courbe noire représente la distribution des cellules provenant du dot-plot « Contrôle », la courbe rouge est du dot-plot « 1 cible parfaite » et la courbe bleue du dot-plot « 3 cibles imparfaites ». **C)** Les dot-plots du jeu de données donnant la **Figure A**. L'axe horizontal et l'axe vertical représentent respectivement l'intensité d'EGFP et de DsRed. Dans le dot-plot Contrôle, la région où se trouvent la majorité des « cellules positives » est délimitée par le polygone, le pourcentage du nombre de cellules y situent par rapport au nombre de « cellules positives » est indiqué (noir). Le même pourcentage est indiqué dans le cas d'une régulation en mode siARN (rouge) et d'une régulation en mode miARN (bleu).

Dans cet exemple, l'efficacité de la régulation en mode siARN (1 cible parfaite) est clairement plus importante que celle de la régulation en mode miARN (3 cibles imparfaites). En fait, ce type d'analyses basées seulement sur les valeurs moyennes n'utilise qu'une petite partie des informations fournies par la cytométrie en flux. Cette analyse est équivalente à celle habituellement faite avec les constructions luciférase et fournit une conclusion équivalente : le silencing en mode miARN est moins efficace que celui en mode siARN. Pourtant un examen des nuages de points suggère une conclusion différente : le silencing peut être aussi efficace dans les deux modes, cependant, dans le cas du mode miARN, il n'opère pas dans toutes les cellules. Pour quantifier cet aspect il est utile de mesurer le nombre de cellules encore présentes dans la région de départ ; alors qu'en mode siARN moins de 2 % des cellules sont dans cette région, le pourcentage monte à plus de 12 % en mode miARN (Fig. 27C). De plus, la distribution au sein de cette région est différente dans les deux cas puisqu'en mode siARN les cellules restantes sont situées à la bordure gauche de la région, ce qui indique que ce sont des cellules qui expriment peu l'EGFP. Au contraire, en mode miARN, on observe que les cellules se répartissent dans l'ensemble de la région de départ, suggérant qu'elles correspondent à des cellules où l'expression de l'EGFP n'est pas modifiée. Cette observation inattendue indique que dans une petite partie des cellules, la régulation en mode miARN n'est quasiment pas établie.

Une présentation différente de cet aspect est illustrée dans la Figure 27B qui présente des histogrammes de l'expression de l'EGFP pour une sous-population cellulaire définie par rectangle indiqué en noir, rouge ou bleu en fonction du jeu de données. Le principe d'une telle analyse est que le niveau d'expression de la DsRed est un indicateur de l'activité du promoteur dans les cellules et donc qu'en choisissant une valeur de la DsRed (ici comprise entre 100 et 150), on restreint l'analyse à une population de cellules qui expriment le même niveau de la construction indicatrice. La première conséquence est que l'histogramme des cellules de la situation contrôle est beaucoup plus resserré (Fig. 27B) que dans une analyse globale (Fig. 26B). Ceci reflète simplement la corrélation de l'expression entre les deux protéines fluorescentes. Comme montré dans la Figure 27B, la régulation en mode siARN (cible parfaite, courbe rouge, histogramme en haut) déplace toutes les cellules vers la gauche de l'histogramme par rapport au contrôle (courbe noire), donc le niveau d'EGFP diminue dans toutes ces cellules. L'amplitude du silencing mesuré soit en déplacement sur l'histogramme ou en valeur moyenne de fluorescence est de l'ordre de 25 fois. Pour la régulation en mode miARN (3 cibles imparfaites, courbe bleue, histogramme en bas), la

distribution des cellules est bimodale : une majorité est déplacée vers la gauche de la même manière qu'en mode siARN, mais il existe en plus une petite population située au même niveau que dans le contrôle (courbe noire). Cette séparation presque complète en deux populations suggère que selon les cellules il existe soit un silencing fort, soit aucun silencing. On peut même constater que pour les cellules où le silencing est actif, celui-ci tend à être plutôt plus fort que dans le cas d'un silencing en mode siARN. A ce stade de l'étude, les cellules chez lesquelles l'expression de l'EGFP n'est pas diminuée par une transfection de petit ARN régulateur sont désignées par « cellules résistantes ».

B. Les « cellules résistantes » ont été transfectées par les petits ARN

Une première interprétation possible de l'existence de ces cellules résistantes à la régulation en mode miARN est un problème d'efficacité de transfection du petit ARN : elle pourrait simplement indiquer que ces cellules n'ont pas reçu une quantité suffisante de petit ARN. Toutefois on peut noter que les données obtenues en parallèle sur le mode siARN ne sont pas en faveur de cette interprétation puisqu'avec la co-transfection du même petit ARN régulateur, on obtient un silencing dans toutes les cellules. La seule différence entre les deux expériences vient d'une région d'une centaine de nucléotides qui contient les séquences cibles (pour les petit ARN régulateurs) dans les deux plasmides. De plus, les résultats précédemment présentés sur les doses efficaces 50 indiquent que le silencing en mode miARN n'a pas besoin d'une dose nettement supérieure de petit ARN régulateur pour être actif.

Un problème d'efficacité de transfection constitue donc une interprétation peu probable de l'existence d'une population « résistante ». Néanmoins, afin de complètement exclure cette possibilité, des expériences de co-transfection avec un petit ARN *let-7* marqué par le fluorochrome Cy5 ont été réalisées. Cy5 émet dans le rouge lointain et peut être excité par la diode rouge à 635 nm ; ainsi il est possible de détecter simultanément l'EGFP (canal FL1), la DsRed (FL2) et le Cy5 (FL4) dans une analyse en trois couleurs par la cytométrie en flux.

RESULTATS

Variabilité de la régulation par les miARN

Hétérogénéité du silencing miARN : Lignée HEK293 Tet-On

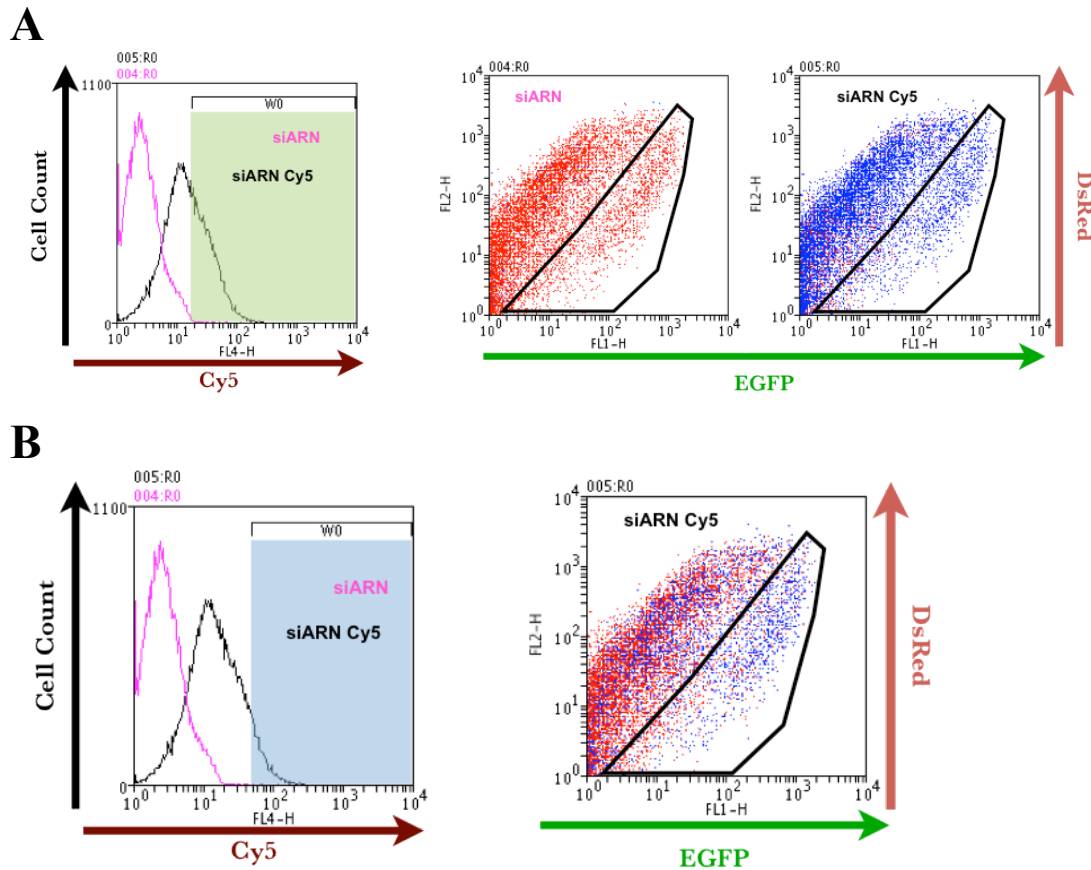


Figure 28, La régulation en mode miARN est inactive chez certaines cellules malgré la présence des petits ARN régulateurs. A) Les cellules HEK293 Tet-On sont transfectées par le plasmide pBiFluo-3milet7 avec 10 nM du petit ARN silet-7b ou la même dose du petit ARN marqué silet-7b-Cy5, l'expression des 2 protéines fluorescentes et la fluorescence de Cy5 des cellules sont mesurées par la cytométrie en flux (triple-marquage) 30 h après l'induction du plasmide. L'histogramme à gauche montre la distribution des cellules ainsi traitées en fonction de leur intensité Cy5 (FL4-H), la courbe noire montre la situation d'une transfection avec silet-7b-Cy5, la courbe violette montre celle d'une transfection avec silet-7b non marqué. La sélection par la région verte élimine l'autofluorescence des cellules en Cy5. Le dot-plot « siARN Cy5 » montre le profil de la régulation en mode miARN induite par silet-7b-Cy5, le dot-plot « siARN » montre celui de la régulation induite par silet-7b non marqué. Les points dont l'intensité Cy5 est supérieure à l'autofluorescence sont en bleu, les autres points sont en rouge. **B)** Les mêmes données sont analysées avec une discrimination plus importante en fonction de l'intensité Cy5. Les points dans le dot-plot à droite sont illustrés en bleu si l'intensité Cy5 des cellules qu'ils représentent entre dans la zone bleue de l'histogramme à gauche. Le polygone noir détermine les cellules « résistantes » au silencing en mode miARN en prenant le même principe montré dans la **Figure 27**. Les expériences de la même nature sont répétées plus de 3 fois, les figures montrées sont représentatives.

Les petits ARN marqués par le Cy5 ont été co-transfectés avec le plasmide portant 3 séquences cibles imparfaites dans des cellules HEK293 Tet-On. L'histogramme à gauche de la Figure 28A montre la distribution des cellules en fonction de leur intensité rouge foncée (valeur FL4-H). Cette intensité est corrélée avec la quantité de petit ARN marqué qu'une cellule reçoit. La courbe violette détermine le niveau d'autofluorescence en FL-4H chez des cellules qui ont reçu des petit ARN non marqués. La courbe noire montre une expérience dans laquelle la transfection est faite avec les petits ARN marqués. Une limitation expérimentale vient de ce que si la fluorescence des cellules transfectées avec le petit ARN *let-7*-Cy5 est nettement supérieure à celle des cellules contrôles (transfectées avec un petit ARN non marqué), les deux distributions ont cependant un recouvrement important (Fig. 28A), ce qui pourrait introduire une ambiguïté dans l'analyse. Aussi seules les cellules dont la fluorescence dans le rouge lointain est supérieure à celle des contrôles seront prises en compte dans la suite (région verte dans la Fig. 28A). Ces cellules positives en Cy5 sont indiquées par des points bleus dans les nuages de points à droite (Fig. 28A) tandis que les points rouges représentent les cellules négatives. On peut constater que la distribution des points bleus est homogène entre les cellules que le silencing soit actif ou non (Fig. 28A, points encadrés par le polygone noir). Compte tenu de ce qu'un seuil assez élevé a été utilisé pour définir les cellules qui ont reçu le petit ARN, il est donc peu probable que les cellules résistantes n'aient pas reçu une quantité suffisante de petit ARN régulateurs. Il est possible de poursuivre cette analyse en utilisant un seuil encore plus élevé pour définir les cellules positives en Cy5 (Fig. 28B, gauche, région rectangulaire bleue claire). Dans ce cas on observe que les cellules « résistantes » sont parmi celles qui ont reçu les doses les plus élevées de petit ARN puisque, de nouveau, elles sont marquées en bleu sur le nuage de points de la Figure 28B. Ces résultats indiquent que la régulation sur des cibles imparfaites n'est pas active dans une partie des cellules bien que les petits ARN régulateurs y soient introduits. Le suivi de la transfection des petits ARN dans une régulation sur une cible parfaite sont disponibles dans l'annexe et confirment qu'il n'y a pas de biais introduit par la transfection dans la répartition des petits ARN.

C. Niveau réel de la régulation en mode miARN est élevé

Une première conséquence de l'existence des cellules résistantes au silencing en mode miARN est qu'elles diminuent la valeur moyenne du silencing. Jusqu'à quel point leur prise en compte dans le silencing moyen change-t-il cette valeur moyenne ? Pour répondre à cette question, j'ai repris les analyses en traitant séparément les sous-populations cellulaires dans lesquelles le silencing est actif ou inactif.

La Figure 29 compare le niveau de la régulation en mode siARN (Fig. 29B) et celui de la régulation en mode miARN (Fig. 29C et D). La Figure 29A est une représentation de la méthode d'exploitation des données. Dans les analyses de la régulation en mode siARN (assurée par le couple pBiFluo-siCXCR4/siCXCR4), toutes les cellules positives sont étudiées. Les cellules positives sont les cellules dont l'intensité de DsRed est supérieure à 1, ce sont alors tous les points dans les nuages de points de la Figure 29 A sauf ceux qui sont sur l'axe EGFP. Le niveau de la régulation est exprimé par la valeur d'expression relative d'EGFP.

Dans les analyses de la régulation en mode miARN (pBiFluo-3miCXCR4/siCXCR4 ou pBiFluo-miCXCR4/siCXCR4), seules les cellules positives qui répondent à la régulation sont considérées, les cellules positives non-réglées par le silencing cible imparfait qui se situent dans la région grise délimitée par le polygone du dot-plot « cible imparfaite » (Fig. 29A) sont exclues de l'analyse. La formule qui permet de calculer l'expression relative de l'EGFP devient :

$$\text{Expression relative d'EGFP} = \frac{EGFP_S}{EGFP_C} * 100$$

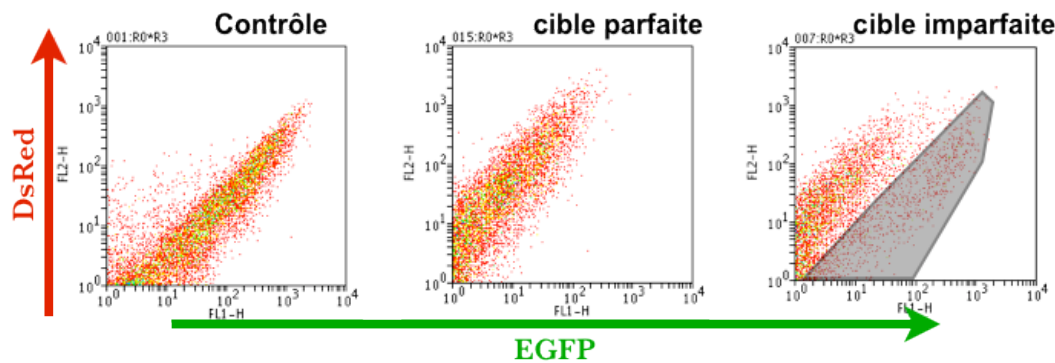
Dans cette formule, $EGFP_C$ représente la même valeur que dans la formule précédente (P. 84). $EGFP_S$, quant à lui, représente la valeur moyenne d'EGFP chez les cellules positives dans la situation où son expression est inhibée sans la prise en compte des cellules masquées par la région grise (Fig. 29A, dot-plot « cible imparfaite »). Toutes ces valeurs d'EGFP sont normalisées par la valeur moyenne de DsRed de la même population cellulaire d'où elles sont extraites.

RESULTATS

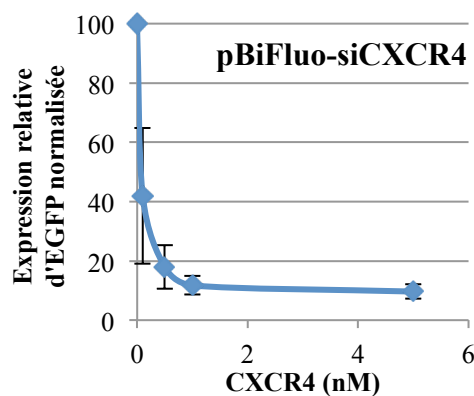
Variabilité de la régulation par les miARN

Hétérogénéité du silencing miARN : Lignée HEK293 Tet-On

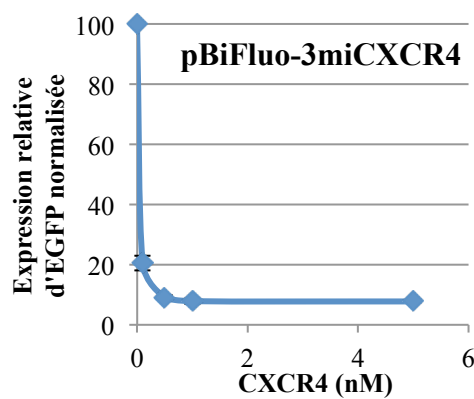
A



B



C



D

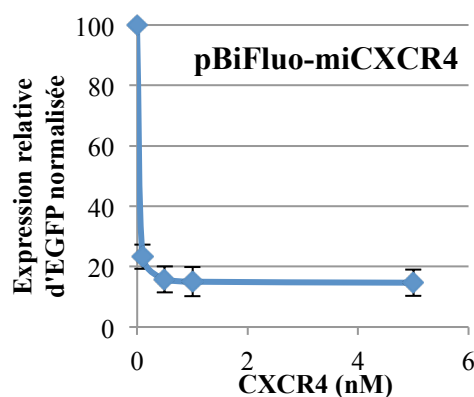


Figure 29, La régulation en mode miARN est très efficace chez les cellules compétentes. pBiFluo-siCXCR4, pBiFluo-3miCXCR4 ou pBiFluo-miCXCR4

est co-transfecté dans les cellules HEK293 Tet-On avec une dose croissante de petit ARN siCXCR4, l'induction de l'expression des gènes rapporteurs a lieu 16 h après la transfection, l'acquisition des données par la cytométrie en flux est effectuée 32 h après l'induction. Le cytomètre est réglé pour optimiser la mesure des cellules dont le niveau d'expression est élevé. **A)** Une démonstration simple de la sélection des cellules pour le calcul du niveau du silencing. **B)** La courbe de dose réponse de la régulation en mode siARN (pBiFluo-siCXCR4). Tous les points positifs (valeur FL2-H supérieure à 1) dans le dot-plot « Contrôle » et le dot-plot « cible parfaite » de la **Figure A** sont inclus dans l'analyse pour le calcul du niveau du silencing. La courbe démontre le changement de l'expression relative d'EGFP (axe Y) en fonction de la dose de siCXCR4 ajoutée dans le système (axe X). **C) et D)** Les courbes de dose réponse de la régulation en mode miARN dans les cellules compétentes (pBiFluo-3miCXCR4 et pBiFluo-miCXCR4 respectivement). Tous les points positifs dans le dot-plot « Contrôle » et les points positifs dans le dot-plot « cible imparfaite » en dehors de la région grise (**Figure A**) sont inclus dans l'analyse pour le calcul du niveau du silencing. Chaque point constituant les courbes est obtenu par au moins 3 expériences indépendantes.

La courbe de dose réponse dans la Figure 29B montre le profil de la régulation en mode siARN (déjà évoqué dans le chapitre précédent). Le plasmide rapporteur pBiFluo-siCXCR4 portant une séquence parfaitement complémentaire avec le petit ARN siCXCR4 est co-transfecté avec différentes quantités de siCXCR4, comme indiquées sur l'axe X. Le niveau maximal du silencing est environ 90 %, ce plateau de l'efficacité est atteint avec 1 nM de siCXCR4 transfecté. La dose efficace 50 est inférieure à 100 pM siCXCR4 transfecté.

Les courbes de dose réponse des cellules chez lesquelles la régulation en mode miARN est active (désignées ci-après par « cellules compétentes ») sont montrées dans la Figure 29C et D. La Figure 29C montre le profil de la régulation induite par siCXCR4 sur trois séquences cibles imparfaites (pBiFluo-3miCXCR4). D'après cette courbe, le taux du silencing en mode miARN chez les cellules compétentes est aussi élevé que celui de la régulation en mode siARN : le niveau maximal du silencing est légèrement supérieur à 90 %, le plateau est atteint avec environ 1 nM siCXCR4 transfecté, la dose efficace 50 est nettement inférieure à 100 pM de siCXCR4 transfecté. Dans le cas où la régulation en mode miARN est induite par une seule séquence cible (utilisation du plasmide pBiFluo-miCXCR4, Fig. 29D), le taux du silencing chez les cellules compétentes est environ 85 %, légèrement plus faible que la régulation en mode siARN, le plateau est atteint avec 1 nM siCXCR4 transfecté, la dose efficace 50 est aussi significativement inférieure à 100 pM de siCXCR4 transfecté. Chez les cellules compétentes où le silencing en mode miARN est réellement active, les 2 paramètres déterminants de l'efficacité, le silencing maximal et la dose efficace 50 du petit ARN régulateur, sont très voisins de ceux de la régulation en mode siARN, suggérant qu'il n'y a pas ou peu de différence en terme de l'efficacité entre ces 2 types de régulations.

De l'autre côté, si la même analyse est faite sur les cellules dans lesquelles la régulation en mode miARN n'est pas établie, nous confirmons les observations visuelles de la Figure 27. La quantification est faite en utilisant la formule ci-dessous pour calculer l'expression relative d'EGFP au sein des cellules résistantes en présence de chaque dose siCXCR4 transfectée :

$$\text{Expression relative d'EGFP} = \text{EGFP}_N / \text{EGFP}_C * 100$$

$EGFP_C$ représente toujours la valeur moyenne d'EGFP chez des cellules positives quand aucune régulation n'est en place pour inhiber l'expression d'EGFP. Contrairement à $EGFP_S$, $EGFP_N$ correspond uniquement à la valeur moyenne des cellules positives masquées par la région grise quand le siCXCR4 est présent dans la culture cellulaire (Fig. 29A, dot-plot « cible imparfaite »). Toutes les valeurs d'EGFP sont normalisées par la valeur moyenne de DsRed dans la même population cellulaire d'où elles sont extraites.

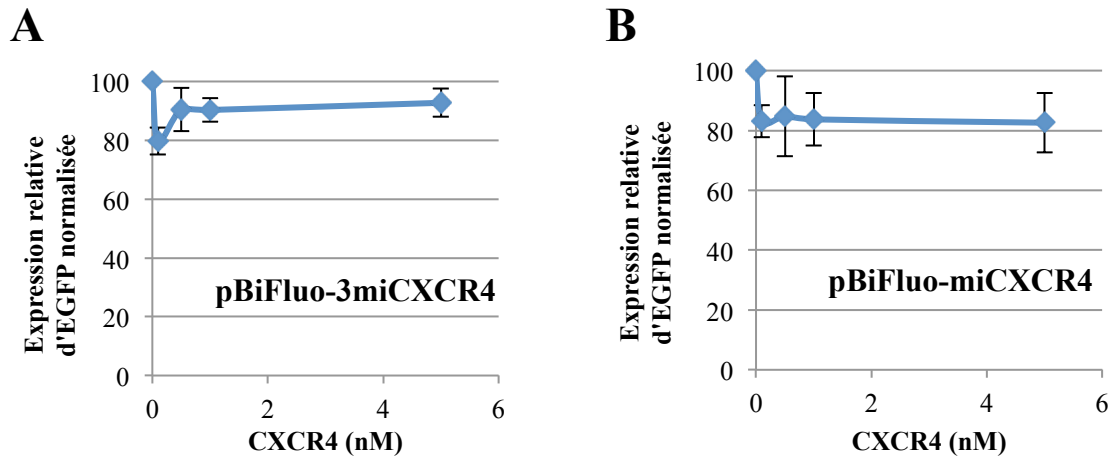


Figure 30, La régulation en mode miARN est quasiment nulle chez les cellules résistantes.

A) La courbe de dose réponse de la régulation en mode miARN dans les cellules résistantes (pBiFluo-3miCXCR4). Les mêmes données de la **Figure 29** sont exploitées différemment. Tous les points positifs (valeur FL2-H supérieure à 1) dans le dot-plot « Contrôle » et les points positifs encadrés par la région grise dans le dot-plot « cible imparfaite » (**Fig. 29A**) sont inclus dans l'analyse pour le calcul du niveau du silencing. La courbe démontre le changement de l'expression relative d'EGFP (axe Y) en fonction de la dose de siCXCR4 ajoutée dans le système (axe X). **B)** La courbe de dose réponse de la régulation en mode miARN dans les cellules résistantes obtenue par pBiFluo-miCXCR4. La méthode d'analyse de la **Figure A** est appliquée. Chaque point constituant les courbes est obtenu par au moins 3 expériences indépendantes.

Parmi les cellules résistantes, la régulation en mode miARN est pratiquement négligeable, comme le montrent les courbes de dose réponse de la Figure 30. Les barres d'erreur importantes sont dues au faible nombre de cellules résistantes ce qui diminue la puissance statistique. Cependant, l'information apportée par ces courbes est claire : par rapport aux cellules compétentes, la régulation en mode miARN dans les cellules résistantes est très limitée, son niveau ne dépasse pas 20 %, quel que soit le nombre de cibles.

Bilan

Ces études mesurent le niveau de la régulation sur des cibles imparfaites au niveau de différentes populations cellulaires. Elles complètent les données sur la valeur moyenne du silencing discutées auparavant. Si l'on restreint l'analyse aux cellules dans lesquelles le silencing est actif, l'efficacité du silencing en mode miARN est comparable avec celle du mode siARN. Ceci est vrai quel que soit le nombre de cibles, même si l'efficacité du silencing augmente légèrement avec ce nombre. L'analyse des cellules résistantes nous indique que la régulation en mode miARN y est pratiquement nulle. Comme ces cellules résistantes ont reçu le petit ARN régulateur et sont capables d'effectuer un silencing en mode siARN, ces données suggèrent très fortement que le silencing en mode miARN est contrôlé par des aspects de la physiologie cellulaire qui seront abordés plus tard dans ce manuscrit.

Dans des cellules HEK293 Tet-On, nous avons mis en évidence que la régulation en mode miARN n'est pas détectable dans une petite partie des cellules (environ 15 % parmi les cellules qui expriment fortement la construction indicatrice). Cette absence de silencing est spécifique de la régulation en mode miARN et n'est pas observée en mode siARN. Avec les résultats présentés précédemment, cette régulation du silencing en mode miARN apparaît comme la différence principale entre les modes miARN et siARN. De plus, la différence observée dans l'efficacité moyenne du silencing est attribuable à cette régulation. Comme cette efficacité moyenne plus faible a été observée dans de très nombreuses expériences avec une grande variété de modèles expérimentaux, on peut se demander si dans tous ces cas elle reflète une régulation du silencing en mode miARN.

Afin de répondre à ces questions, nous avons réalisé des analyses similaires dans d'autres lignées cellulaires.

III. Hétérogénéité de la régulation par les miARN chez d'autres lignées cellulaires

Dans le principe, notre approche expérimentale peut être transposée à d'autres modèles cellulaires que les cellules HEK293 Tet-On. Il existe cependant deux types de difficultés qu'il faut résoudre pour aborder cette question : i) nos constructions indicatrices initiales ont un promoteur régulé par la tétracycline, et donc ne sont utilisable que dans des cellules

exprimant un transactivateur dérivé de l'opérateur tétracycline ; ii) l'interprétation des résultats en terme de régulation du silencing en mode miARN n'est possible que si toutes les cellules ont effectivement été transfectées. Dans cette partie je présente les résultats obtenus avec les cellules U2OS Tet-on et des cellules HeLa sans opérateur tétracycline.

Les cellules HEK293 Tet-On ont été dérivées des cellules HEK293. Ces dernières sont une lignée immortalisée provenant de cellules de rein embryonnaire humain et elles présentent un phénotype de type épithélial même s'il n'est pas très marqué. Pour élargir le champ d'analyse, j'ai utilisé la lignée U2OS Tet-On qui a été dérivée à partir de la lignée d'ostéosarcome U2OS. Il s'agit donc de cellules mésenchymateuses. Enfin, j'ai utilisé des cellules HeLa, une lignée classique dans les laboratoires dérivée d'un adénocarcinome du col utérin. Bien que d'origine épithéliales, les cellules HeLa ont un phénotype en culture variable et une morphologie souvent intermédiaire entre une cellule épithéliale et mésenchymateuse.

A. Hétérogénéité de la régulation par les miARN chez les cellules U2OS Tet-On

Les cellules U2OS Tet-On expriment le transactivateur rtTA d'une manière constitutive comme les cellules HEK293 Tet-On et il est donc possible d'utiliser directement le système pBiFluo pour analyser le silencing en mode miARN. La co-transfection du plasmide et du petit ARN est réalisée avec la Lipofectamine 2000 car la méthode de phosphate de calcium n'a qu'une très faible efficacité dans les cellules U2OS. Une dose de 10 nM de siCXCR4 a été utilisée car elle correspond au plateau du silencing et devrait donc limiter les risques liés aux variations dans l'efficacité de la transfection. Cette dose de petit ARN a été déterminée par des expériences de dose-réponse réalisées chez cette lignée. Les constructions pBiFluo-siCXCR4 et pBiFluo-3miCXCR4 ont été transfectées dans les cellules en l'absence ou en présence de 10 nM de petit ARN régulateur siCXCR4.

Dans la Figure 31, trois nuages de points représentatifs des situations contrôle, cible parfaite et cible imparfaite sont présentés. Le nuage de points « Contrôle » permet d'identifier l'expression des constructions en l'absence de régulation. On remarque que les points se répartissent parallèlement à la diagonale, ce qui indique que l'expression de la DsRed et de l'EGFP est corrélée comme on l'avait observé dans les cellules HEK293 Tet-On. Le profil d'expression est d'ailleurs proche de ceux précédemment observés, même si

l'expression de l'EGFP est plus forte que celle de la DsRed, ce qui se traduit par une localisation à droite de la diagonale.

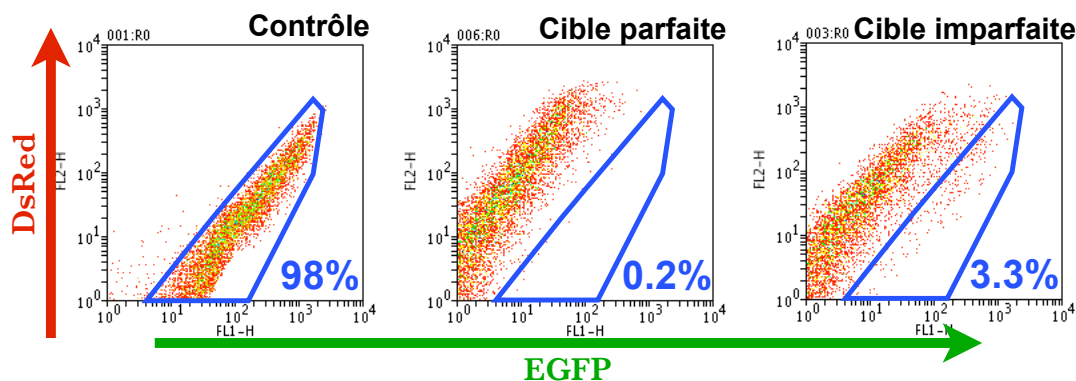


Figure 31, La régulation en mode miARN n'est pas homogène chez les cellules U2OS Tet-ON.

Le plasmide pBiFluo-3miCXCR4 et pBiFluo-siCXCR4 sont co-transfectés séparément avec la même dose (10 nM) de petit ARN siCXCR4 dans les cellules U2OS Tet-On, le pBiFluo-siCXCR4 est transfecté seul pour déterminer la position du nuage de points dans la situation contrôle, qui est encadrée par le polygone bleu dans le dot-plot « Contrôle ». Le même polygone délimite les cellules résistantes dans les dot-plots « Cible parfaite » et « Cible imparfaite ». Le pourcentage des cellules ainsi délimitées est indiqué. L'axe horizontal et l'axe vertical des dot-plots représentent respectivement l'intensité d'EGFP et de DsRed.

En présence du petit ARN régulateur, les nuages de points « Cible parfaite » et « Cible imparfaite » sont déplacés vers des valeurs plus faibles de l'EGFP indiquant un silencing efficace. Par analogie avec l'analyse effectuée dans les cellules HEK293 Tet-On, on peut rechercher si le silencing est actif dans toutes les cellules en identifiant la position des cellules contrôles par un polygone bleu dans la figure contrôle. Cette population représente 98 % des cellules parmi l'ensemble des cellules positives. Si la régulation en mode siARN est en place (Fig. 31, « Cible parfaite »), le pourcentage des cellules présentes dans ce même polygone chute à 0,2 %, en accord avec une inhibition de l'expression de l'EGFP dans toutes les cellules positives. Ainsi, la régulation en mode siARN est active dans l'ensemble des cellules. Par contre, dans le cas du mode miARN, 3,3 % des cellules sont encore présentes dans le polygone bleu (Fig. 31 « Cible imparfaite »), soit plus de 10 fois plus que dans le cas du silencing en mode siARN. Ainsi, dans une partie des cellules, l'expression de l'EGFP du plasmide pBiFluo-3miCXCR4 n'est pas inhibée ou est très peu inhibée par le petit ARN régulateur siCXC4 à la différence de ce qui est observé dans le mode siARN. La proportion des cellules résistantes est plus faible que dans le cas des HEK293 mais elles sont néanmoins clairement détectables.

Comme dans les cellules HEK293 Tet-On, le silencing en mode miARN n'est actif que dans une partie des cellules U2OS Tet-On. Les caractéristiques globales de ces expériences sont d'ailleurs très proches dans les deux types cellulaires : silencing efficace et homogène pour le mode siARN ; silencing efficace dans une majorité de cellules pour le mode miARN avec une petite population qui ne présente aucune indication d'un silencing.

B. Hétérogénéité de la régulation par les miARN chez les cellules HeLa

Afin de pouvoir effectuer les expériences dans les cellules HeLa, nous avons modifié les plasmides rapporteurs en mettant l'expression des mêmes protéines fluorescentes sous le contrôle du promoteur CMV (Fig. 32A). L'activité du promoteur CMV étant constitutive et dépendant de facteurs de transcription exprimés par de nombreux types cellulaires, ces constructions pourront donc être utilisées dans toute cellule efficacement transfectable. A la différence du modèle pBiFluo, deux plasmides distincts sont nécessaires chacun exprimant une seule protéine fluorescente. Néanmoins, comme dans le système pBiFluo, l'expression de la DsRed peut être utilisée comme un indicateur de l'activité du promoteur dans une cellule. Les séquences cibles pour différents petits ARN régulateurs ont été insérées dans la région 3' non codante de l'ARNm EGFP générant des constructions très proches de celles utilisées précédemment.

La Figure 32C montre trois exemples représentatifs des données de cytométrie en flux obtenues avec les cellules HeLa. Les plasmides et le petit ARN sont co-transfectés dans les cellules HeLa avec la Lipofectamine 2000 car la méthode au phosphate de calcium est peu efficace dans la lignée que nous utilisons au laboratoire. Dans ces exemples, les cellules sont transfectées par un plasmide exprimant la DsRed (**pCMV-DsRed**), un plasmide exprimant l'EGFP, **pCMV-siCXCR4** qui porte 1 séquence parfaitement complémentaire avec le petit ARN siCXCR4 ou **pCMV-3miCXCR4** qui porte 3 séquences partiellement complémentaires et le cas échéant 2 nM de petit ARN siCXCR4. Cette dose de petit ARN régulateur est déterminée par des expériences de dose-réponse afin qu'elle puisse induire un silencing maximal dans ce contexte expérimental.

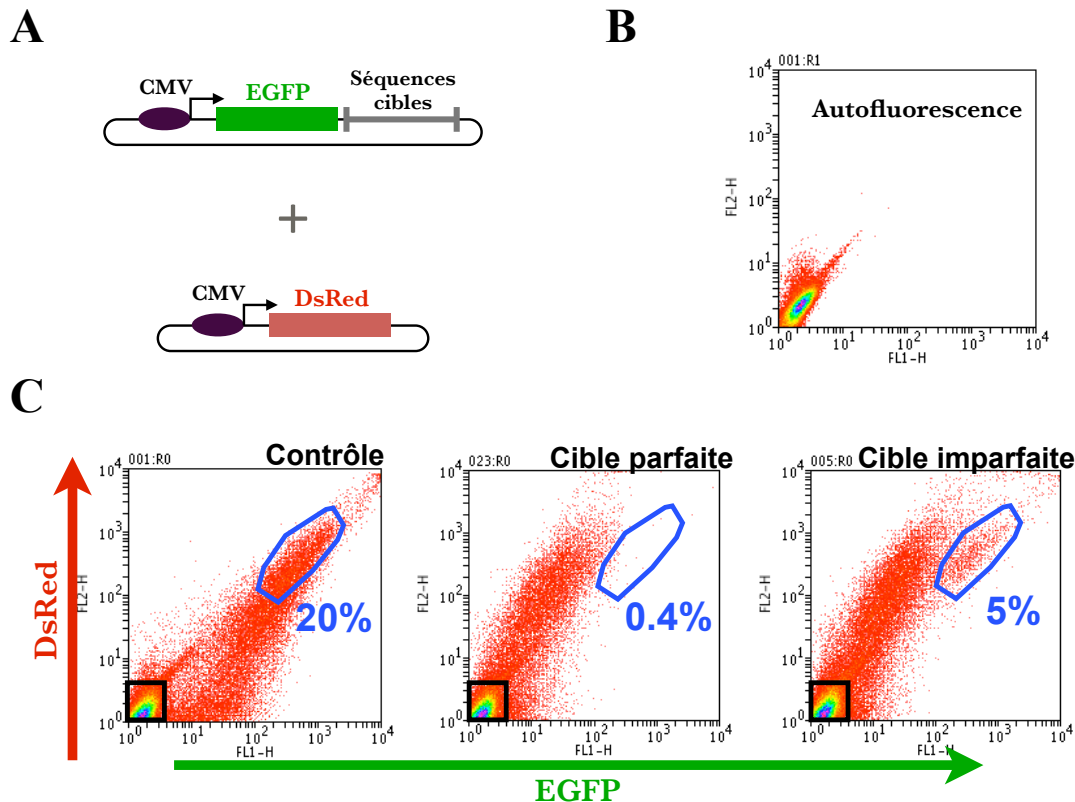


Figure 32, Le silencing en mode miARN est variant chez les cellules HeLa de la même préparation expérimentale. **A)** Schémas des plasmides rapporteurs contrôlés par le promoteur CMV utilisés dans les cellules HeLa. Les différentes séquences cibles sont introduites en aval de la région codante de l'EGFP. Toutes les expériences dans les cellules HeLa sont établies par une co-transfection de la même quantité d'un plasmide « rouge » (pCMV-DsRed) plus un plasmide « vert » portant différentes séquences cibles. **B)** Dot-plot des cellules HeLa transfectées par un plasmide vide, le niveau de l'autofluorescence des cellules est déterminé. **C)** Les cellules HeLa transfectées par pCMV-DsRed/pCMV-siCXCR4 sans ou avec 2 nM du petit ARN régulateur siCXCR donnent respectivement le dot-plot « Contrôle » et « Cible parfaite », celles transfectées par pCMV-DsRed/pCMV-3miCXCR4 avec 2 nM siCXCR4 donnent le dot-plot « Cible imparfaite ». Le polygone bleu détermine la position initiale du nuage de points correspond aux cellules « forts expresseurs » dont l'EGFP n'est pas soumise à la régulation ou la régulation n'est pas active. Le pourcentage des cellules y sont délimitées par rapport aux cellules positives (en excluant les cellules autofluorescentes entourées par le rectangle noir) est affiché pour chaque dot-plot.

Le premier nuage de points illustre le profil d'expression de la DsRed et de l'EGFP dans des cellules HeLa. La forme du nuage de points diffère de plusieurs manières de celles précédemment présentées. Tout d'abord, la force du promoteur CMV étant un peu plus faible que celle du promoteur induit par la tétracycline, il est possible de détecter presque toutes les cellules en une seule lecture par le cytomètre. Aussi, on peut voir, dans le nuage de points, les cellules qui n'expriment pas ou très peu les plasmides transfectés, elles ont

encadrées en noir dans l'angle inférieur gauche du diagramme. Les signaux détectés correspondent à l'autofluorescence des cellules (comparable avec la Figure 32B). Pour les niveaux d'expression moyens à forts (DsRed ou EGFP > 50), on peut observer une bonne corrélation entre l'expression des deux plasmides avec une répartition des cellules le long de la diagonale du diagramme (Fig. 32C « Contrôle »). Par contre, pour les cellules « faibles expresseuses » (DsRed < 20), on observe une distribution fortement biaisée en faveur de l'EGFP. Le mécanisme conduisant à deux profils en fonction du niveau d'expression n'est pas identifié. Dans cette analyse, je vais me concentrer sur les cellules « fortes expresseuses » pour lesquels il existe une bonne corrélation entre la DsRed et l'EGFP. A l'image de ce qui a été vu précédemment, l'introduction du petit ARN induit un déplacement important vers la gauche du nuage de points, en accord avec un silencing efficace de l'EGFP. Comme on peut s'y attendre, ceci n'est pas vrai pour les cellules qui n'expriment pas les plasmides, l'autofluorescence étant insensible aux petits ARN.

La comparaison des nuages de points « Cible parfaite » et « Cible imparfaite » (Fig. 32C) révèle de nouveau une différence entre ces deux types de régulations. Ceci est apparent si l'on considère les cellules qui, dans le contrôle, ont un niveau d'expression compris entre 100 et 2000 pour les deux protéines fluorescentes et qui sont indiquées par le polygone bleu. Pour le plasmide pCMV-3miCXCR4, on observe une sous-population cellulaire dont les niveaux de fluorescence ne sont pas modifiés par rapport au contrôle (Fig. X13B dot-plot « Cible imparfaite » et « Contrôle »). Par contre, pour le plasmide pCMV-siCXCR4, il ne reste pratiquement aucune cellule avec les niveaux de fluorescence initiaux et le silencing est associé à un déplacement de l'ensemble des cellules. Une quantification du nombre de cellules présentes dans la région considérée (polygone bleu) indique qu'il est de 20 % dans le contrôle, 0,4 % avec un silencing en mode siARN et 5 % en mode miARN. Ceci suggère donc que dans la population des cellules « fortes expresseuses », le silencing en mode miARN n'est pas détectable dans une cellule sur quatre contre une cellule sur cinquante pour le mode siARN. L'augmentation de la quantité de petit ARN régulateur dans la transfection ne change pas l'abondance de cette population (données disponible dans l'annexe).

Ces données indiquent que dans les cellules HeLa, comme dans le cas de HEK293 et U2OS, il existe une population cellulaire dans laquelle la régulation en mode miARN n'est pas active. A la différence des exemples précédents, ces données attirent l'attention sur

l'importance du niveau d'expression. Une autre explication de ces résultats pourrait donc être une saturation du silencing en mode miARN dans les cellules « fortes expresseuses ». Toutefois, dans ce cas on s'attendrait à une diminution progressive de l'efficacité du silencing qui se manifesterait sur l'ensemble de la population et donc infléchirait le nuage de points pour le rapprocher de la diagonale aux fortes valeurs de fluorescence. Au contraire, comme dans les cas précédents, on peut observer l'existence d'une population résistante complètement distincte de celles des cellules compétentes. Bien que le système rapporteur et la méthode d'introduction des molécules d'ADN et d'ARN soient différents, les résultats que l'on obtient en utilisant les cellules HeLa vont dans le même sens que les observations dans les cellules HEK293 Tet-On : parmi une population de cellules qui reçoivent un petit ARN régulateur, le silencing en mode miARN est quasiment inactif dans certaines cellules tandis qu'il est hautement efficace dans les autres. La proportion de ces cellules est modérée mais atteint 25 % parmi les cellules « fortes expresseuses ». Le silencing en mode siARN est cependant actif dans toutes les cellules qui expriment les constructions.

Bilan

L'analyse du silencing en mode miARN dans les cellules HEK293 Tet-On a mis en évidence une population de cellules « résistantes » mais qui en fait ont été transfectées par le petit ARN régulateur. Cette absence de silencing reflète donc une régulation du silencing qui concerne spécifiquement le mode miARN. Dans cette partie nous avons montré qu'un phénomène similaire peut-être observé dans d'autres types cellulaires comme les lignées HeLa et U2OS Tet-On. Pour des raisons techniques, les expériences dans ces deux lignées n'ont pas été faites de la même manière : la méthode de transfection et/ou le promoteur contrôlant l'expression des protéines fluorescentes sont différents. Malgré tout, la même conclusion peut être atteinte sur l'existence d'une population dans laquelle le silencing en mode miARN n'est pas détectable alors que toutes les cellules présentent un silencing en mode siARN. L'utilisation de conditions expérimentales différentes indique aussi que cette observation est robuste et ne dépend pas d'un aspect particulier de l'approche expérimentale.

Puisque la cytométrie permet d'identifier les cellules dans lesquelles le silencing est inefficace, cette approche peut permettre d'analyser en quoi ces cellules diffèrent de celles dans lesquelles le silencing est actif.

Chapitre III. Facteurs affectant la régulation en mode miARN

L'observation que la régulation en mode miARN n'est pas active dans toutes les cellules est une donnée nouvelle sur le fonctionnement des miARN. Ce résultat ne pouvait pas être obtenu par les approches utilisant la luciférase comme gène rapporteur pour étudier cette thématique car elles ne fournissent qu'une valeur moyenne sur une population cellulaire et ne peuvent donc distinguer les différences éventuelles parmi les cellules d'un même échantillon. La découverte des cellules résistantes uniquement au silencing en mode miARN confirme l'existence de mécanismes différents entre le silencing en mode siARN et en mode miARN. De plus ces cellules résistantes expliquent pour une grande part la différence d'efficacité du silencing moyen entre les deux modes. Ainsi, plutôt qu'un mécanisme intrinsèquement moins efficace, la régulation en mode miARN diffère surtout par le fait qu'elle est soumise à un contrôle par la cellule qui peut la rendre complètement inopérante.

Le fait que le silencing en mode siARN soit actif même dans toutes les cellules suggère que c'est après l'assemblage des complexes Argonaute/petit ARN qu'intervient une régulation du silencing en mode miARN. Cette régulation pourrait concerner soit l'expression de l'un des membres du complexe miRISC, soit un contrôle de l'activité des membres de ces complexes, par exemple à travers des modifications post-traductionnelles. Une première possibilité pourrait être qu'au sein de la population cellulaire utilisée pour nos expériences, il existe deux sous populations, l'une compétente pour la régulation en mode miARN (cellules « compétentes ») et l'autre non (cellules « résistantes »). Dans cette partie j'ai recherché si après isolement de cellules « résistantes » et « compétentes », elles maintenaient leur phénotype initial au cours d'une culture *in vitro*.

I. La résistance à la régulation par les miARN n'est pas un caractère stable

Les lignées cellulaires en culture sont généralement supposées être homogènes surtout dans les situations comme celles des cellules HEK293 Tet-on où les cellules ont été transfectées et ont donc été isolées sous forme clonale avant d'être cultivées à grande

échelle. Cependant, rien n'assure qu'au cours d'une propagation en culture pour une durée indéterminée, mais comprenant probablement de nombreux passages (en ce qui concerne le maintien des cellules au sein du laboratoire, les expériences sont réalisées avec des cellules n'ayant pas plus d'une vingtaine de passages, soit de l'ordre de 70 générations), cette homogénéité soit absolument maintenue.

Afin de tester si les cellules « résistantes » pourraient correspondre à une sous-population particulière, nous avons utilisé le tri cellulaire pour purifier les cellules « résistantes » et « compétentes ». Le principe de l'expérience est de trier les cellules sur la base d'une première analyse du silencing en mode miARN, de les remettre en culture, puis de tester l'efficacité du silencing. Pour avoir des mesures complètement indépendantes du silencing lors des deux tests, il est nécessaire que les cellules soient maintenues en culture pendant environ sept jours de manière à ce que les petits ARN de la première transfection ne soient plus présents lors du deuxième test. Dans les expériences présentées plus haut et réalisées en transfection transitoire, la proportion des cellules « résistantes » sur l'ensemble des cellules est faible : elle ne représente que de 1 % à 2 % de la population totale (la discussion des résultats et les pourcentages montrés dans les chapitres précédents sont calculés par rapport aux cellules positives qui expriment fortement les gènes rapporteurs afin de mieux cibler l'analyse). Purifier une telle sous-population est techniquement possible mais nécessite de partir d'un grand nombre de cellules et de permettre à une petite population obtenue après le tri de proliférer suffisamment en la gardant en culture plus longtemps. Pour ces raisons techniques j'ai exploré la possibilité d'obtenir des clones stables qui expriment la construction indicatrice dans toutes les cellules afin de faciliter le tri. L'utilisation des cellules exprimant les rapporteurs d'une manière stable et homogène permet aussi de suivre le silencing avec un intervalle plus bref après le tri.

A. Sélection et validation des clones stables HEK293 Tet-On

La sélection des clones stables HEK293 Tet-On exprimant les plasmides rapporteurs est assurée par la co-transfection du plasmide d'intérêt avec un plasmide porteur d'un gène de résistance à l'antibiotique puromycine (plasmide pBSpac) suivie par une sélection des clones positifs qui résiste à l'antibiotique. Le gène de résistance est sous le contrôle du promoteur précoce de SV40 qui lui confère une expression constitutive dans les cellules mammifères.

Le schéma de la sélection et de la caractérisation des clones est présenté sur la Figure 33. La co-transfection du marqueur de sélection et du plasmide indicateur est faite avec un rapport molaire de 1 à 4 pour accroître les chances que les cellules résistantes expriment effectivement la construction indicatrice. De plus, comme les expériences ont lieu en cellules Tet-on, il faut tester l'inductibilité de la construction par la doxycycline. Après 8 à 10 jours de sélection en présence de 1 µg/ml de puromycine, seules les cellules ayant reçu et exprimant le gène de résistance sont encore viables et forment des clones visibles. Ces clones sont prélevés et remis en culture individuellement sans puromycine. Pour tester l'expression de la construction indicatrice, les clones stables ainsi sélectionnés sont passés au cytomètre pour vérifier l'expression des gènes rapporteurs (DsRed et EGFP) après induction par la doxycycline.

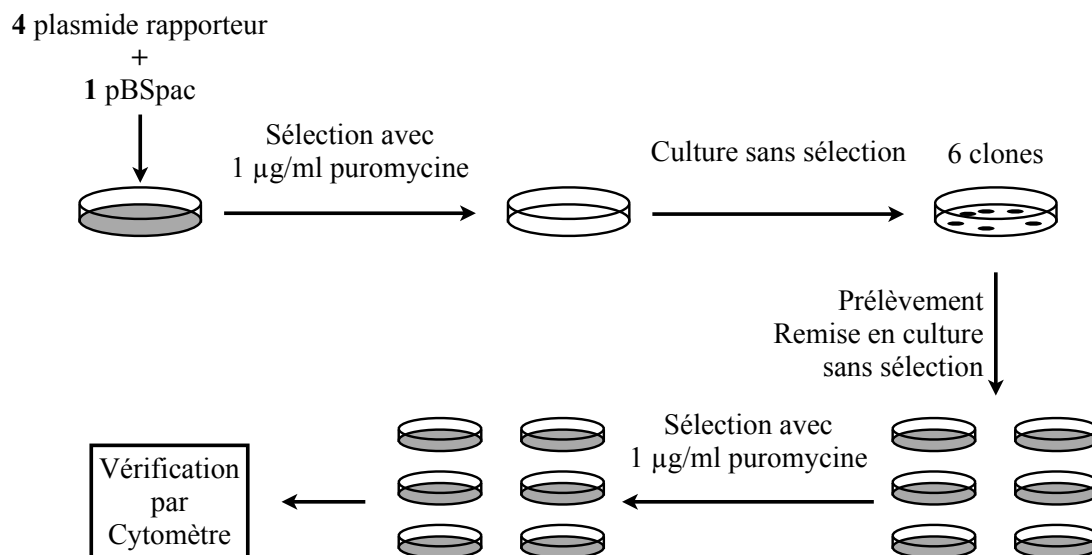


Figure 33, Schéma de la sélection et de la caractérisation de cellules transfectées de manière stable avec une construction indicatrice

Les nuages de points de la Figure 34A montrent le profil d'expression du clone numéro 6 obtenu après transfection des HEK293 Tet-On par pBiFluo-2miCXCR4 (désigné ci-après 2miCXCR4-CL6) et sa réponse à la régulation par le petit ARN siCXCR4. Pour le contrôle, les cellules ont été transfectées avec 2 nM de petit ARN contrôle siCD9. Le nuage de points « Cible imparfait » est le résultat d'une expérience où le petit ARN régulateur siCXCR4 est transfecté à 2 nM. Afin que l'efficacité de la transfection des petits ARN soit comparable avec les expériences dans lesquelles le plasmide est introduit par la transfection transitoire, les petits ARN sont toujours co-transfectés dans les cellules

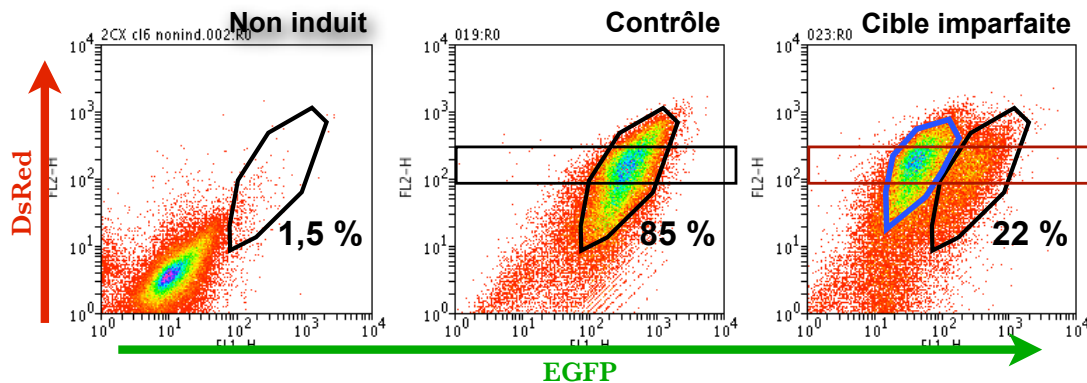
RESULTATS

Facteurs affectant la régulation en mode miARN

Régulation miARN et prolifération cellulaire

accompagnés par un plasmide entraîneur qui n'exprime aucune protéine fluorescente (Une série de dose réponse des cellules 2miCXCR4-CL6 au petit ARN siCXCR4 est présentée dans l'annexe).

A



B

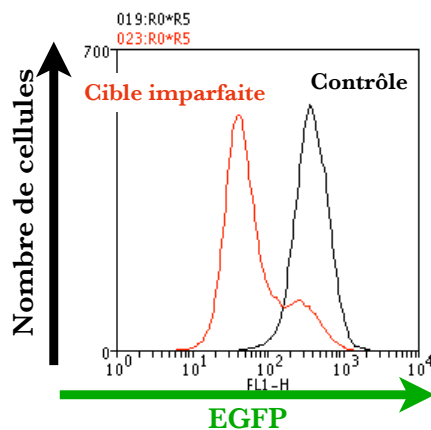


Figure 34, La régulation en mode miARN n'est pas homogène dans les clones stables HEK293 Tet-On. Les expériences sont réalisées dans le clone stable 2miCXCR4-CL6. **A)** Les nuages de points montrent l'expression de l'EGFP et de la DsRed. Les cellules dans le dot-plot « Non induit » sont cultivées dans un milieu sans doxycycline. Dans le contrôle les cellules ont été transfectées avec 2 nM de petit ARN contrôle siCD9 et l'expression des transgènes a été induite par la doxycycline. Les mêmes conditions ont été utilisées dans les expériences donnant le nuage de points

« cible imparfaite », mais avec 2 nM de petit ARN régulateur siCXCR4. **Le polygone noir** détermine la position du nuage de points correspondant à la population majoritaire des cellules en l'absence de silencing par les petits ARN. Le pourcentage des cellules encadrées par ce polygone par rapport aux cellules positives est indiqué pour chaque dot-plot. **Le polygone bleu** indique la position du nuage de points représentant des cellules dont l'expression d'EGFP est inhibée par siCXCR4. **B)** Histogramme montrant la distribution des cellules en fonction de leur intensité d'EGFP. Seules les cellules délimitées par le rectangle noir ou rouge dans les dot-plots de la **Figure A** sont incluses. La courbe noire montre la situation contrôle (dot-plot « Contrôle ») et la courbe rouge indique la situation où les cellules sont soumises à une régulation en mode miARN (dot-plot « Cible imparfaite »).

Le dot-plot « Non induit » de la Figure 34A montre qu'en absence d'induction par la doxycycline, le niveau basal d'expression des deux transgènes EGFP et DsRed est faible mais détectable, soulignant que le promoteur bidirectionnel a une activité consécutive basale après l'intégration dans le génome. L'intensité de fluorescence des deux protéines

chez la majorité des cellules (région en verte ou bleue) ne dépasse pas 40. Quand l'expression est induite (Fig. 34A « Contrôle »), l'intensité d'EGFP et de DsRed est considérablement augmentée, elles varient entre 100 et 1000 chez la population majoritaire encadrée par le polygone noire. On peut constater que l'expression des protéines fluorescentes dans le clone 2miCXCR4-CL6 est plus homogène que dans les expériences de transfection transitoire, le niveau de fluorescence de la majorité des cellules variant dans une fenêtre de deux ordres de grandeur. La sensibilité des détecteurs pour ces analyses étant plus élevée que celle utilisée précédemment, le niveau d'expression des gènes rapporteurs est plus faible dans les cellules 2miCXCR4-CL6 que dans les cellules « fortes expresseuses » des transfusions transitoires. La transfection de 2 nM de siCXCR4 induit un déplacement d'une grande partie des cellules vers les valeurs plus faibles de FL1-H (Fig. 34A « Cible imparfaite », les points entourés par le polygone bleu). Ce décalage du nuage de points, comme dans les expériences de transfection transitoire indique un silencing de l'expression d'EGFP par le petit ARN siCXCR4 qui est de l'ordre de 10 fois. Dans la région encadrée par le polygone noir qui définit la position initiale du nuage de points, on peut observer la présence d'un nombre important de cellules dans lesquelles l'expression de l'EGFP n'est pas altérée par siCXCR4. Dans la situation contrôle (Fig. 34A « Contrôle », le polygone noir comprend environ 85 % des cellules positives (DsRed > 1). La proportion des cellules résistantes au silencing en mode miARN (Fig. 34A « Cible imparfaite) est d'environ 22 %. La Figure 34B montre les histogrammes de l'EGFP correspondant aux cellules encadrées par les rectangles dans les nuages de points correspondants. On constate que pour ces cellules exprimant au même niveau les transgènes, silencing en mode miARN (courbe rouge) est clairement visible par rapport au contrôle (courbe noire), mais aussi que, comme dans les expériences de transfection transitoire, il est pratiquement inexistant dans une partie des cellules. Nous retrouvons donc la même conclusion dans les clones stables de HEK293 Tet-On : le silencing en mode miARN est hétérogène au sein de la population cellulaire. La « résistance » au silencing est donc observable sur des transcrits exprimés à partir d'un transgène intégré dans le génome de la cellule. De plus, l'utilisation des clones stables augmente la proportion des cellules résistantes parmi l'ensemble des cellules en culture, environ 15 % sur la totalité de cellules analysées par la cytométrie ne répondent pas au silencing (ce pourcentage est de l'ordre de 2 % de la population totale dans une expérience où les gènes rapporteurs sont introduits de manière transitoire). Cette augmentation facilite la mise en œuvre des expériences de tri des cellules « résistantes ».

J'ai essayé sans succès d'isoler des clones stables contenant les plasmides rapporteurs avec une séquence cible parfaitement complémentaire avec les petits ARN régulateurs (pBiFluo-siCXCR4 ou pBiFluo-silet7). En effet, la majorité des clones résistants à l'agent de sélection, quel que soit le plasmide intégré, n'exprime qu'une seule protéine fluorescente et ne sont donc pas adaptés à notre analyse des données. Les raisons de ces difficultés ne sont pas claires, mais un élément est la nécessité d'une intégration qui respecte l'organisation du plasmide et correspond donc à la linéarisation par une cassure double-brin d'ADN dans la région plasmidique couvrant aucune région codante des protéines fluorescentes. Dans le cas d'une intégration dans la région DsRed ou EGFP de la construction, les cellules peuvent toujours exprimer l'autre protéine fluorescente mais évidemment pas les deux. Une possibilité pour augmenter la probabilité de succès serait de transfecter un plasmide déjà linéarisé dans la région plasmidique n'affectant pas l'expression des gènes rapporteurs. En l'absence de clone stable avec une construction ayant une cible parfaite, il n'est pas possible de comparer directement le silencing en mode siARN et en mode miARN.

B. Les cellules « résistantes » sont compétentes pour la régulation en mode miARN

Le schéma expérimental est présenté dans la Figure 35A. Les cellules 2miCXCR4-CL6 sont d'abord transfectées avec 2 nM siCXCR4 qui assure un silencing maximal en mode miARN du fait de la nature des séquences présentes dans la construction indicatrice. A 48 h deux populations cellulaires sont isolées par FACS (Fluorescence Activated Cells Sorting) : les cellules « résistantes » et « compétentes ». Les nuages de points de la Figure 35B montrent les fenêtres utilisées pour le tri dans le profil de fluorescence, la région **C** définit les cellules « compétentes » et la région **R** les cellules « résistantes ». Il faut noter que les données acquises par le cytomètre trieur comme montrées dans ce dot-plot de la Figure 35B se présentent différemment que celles obtenues par un cytomètre analyseur du fait des caractéristiques de l'appareil et des réglages utilisés. Cependant, le nuage de point « Trier » est approximativement comparable à celui de nos analyses faites en cytométrie analyseur (nuage de points « Analyseur »). En particulier on peut observer l'existence de deux populations, l'une avec un silencing efficace et l'autre pratiquement sans silencing. Les deux populations de cellules ainsi collectées sont ensuite remises en culture séparément, l'utilisation des cellules du clone stable 2CXC4-CL6 permettant d'obtenir des

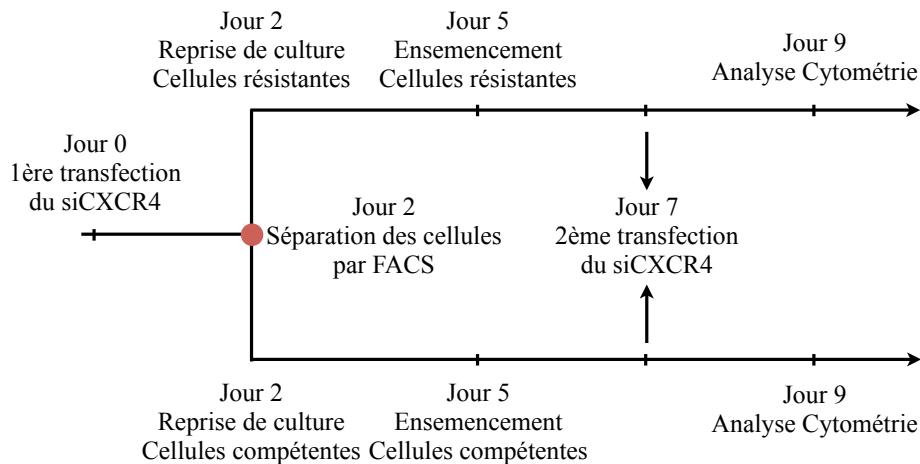
RESULTATS

Facteurs affectant la régulation en mode miARN

Régulation miARN et prolifération cellulaire

populations abondantes, la reprise de la culture est rapide. 7 jours après le tri, les deux populations de cellules sont soumises à une nouvelle mesure de la régulation par le petit ARN CXCR4 par la deuxième transfection de 2 nM siCXCR4.

A



B

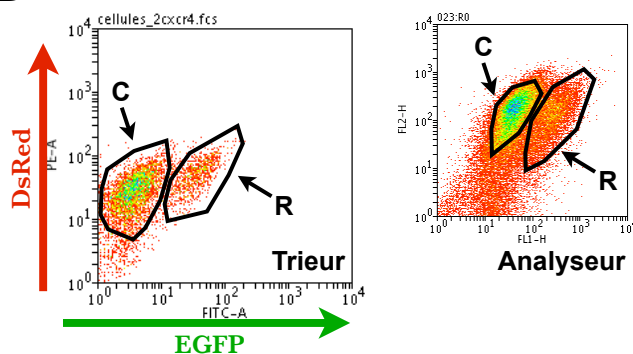


Figure 35, Schéma de l'analyse du silencing dans les sous-populations triées. Le clone stable 2miCXCR4-CL6 est utilisé, l'expression des transgènes est induite 32 h avant l'analyse. **A)** Le schéma expérimental de l'expérience d'analyse du silencing en mode miARN chez les cellules compétentes et résistantes. **B)** La

définition des cellules « compétentes » et « résistantes » au silencing en mode miARN durant le tri cellulaire. Les dot-plots montrent le niveau d'EGFP (X) et de DsRed (Y) dans les cellules analysées. Le dot-plot « Trieur » montre les données à l'issue d'une acquisition effectuée par un cytomètre trieur, les cellules délimitées par le polygone « C » sont collectées en tant que cellules compétentes au silencing ; les cellules entourées par le polygone « R » sont récoltées en tant que cellules résistantes au silencing. Les données obtenues par un cytomètre analyseur sont démontrées dans le dot-plot « Analyseur ».

L'analyse effectuée retient la population majoritaire donc les régions délimitées par les polygones dans les nuages de points (Fig. 36). Cette population représente autour de 80 % parmi les cellules positives (DsRed > 1). La Figure 36 compare le silencing en mode miARN dans trois populations de cellules 2miCXCR4-CL6 : les diagrammes « I » correspondent aux cellules initiales non triées et qui n'ont pas été soumises à un silencing par le petit ARN CXCR4 auparavant, « C » celles qui ont été isolées sur la base d'un silencing actif (Fig. 35B « Trieur », région « C ») et « R » sur la base de l'absence de

RESULTATS

Facteurs affectant la régulation en mode miARN

Régulation miARN et prolifération cellulaire

silencing (Fig. 35B « Trieur », région « R »). La ligne « Contrôle » correspond à la transfection de 2 nM de siCD9 (Fig. 36A), tandis que la ligne « Cible imparfaite » correspond à la transfection de 2 nM du petit ARN régulateur siCXCR4 (Fig. 36B).

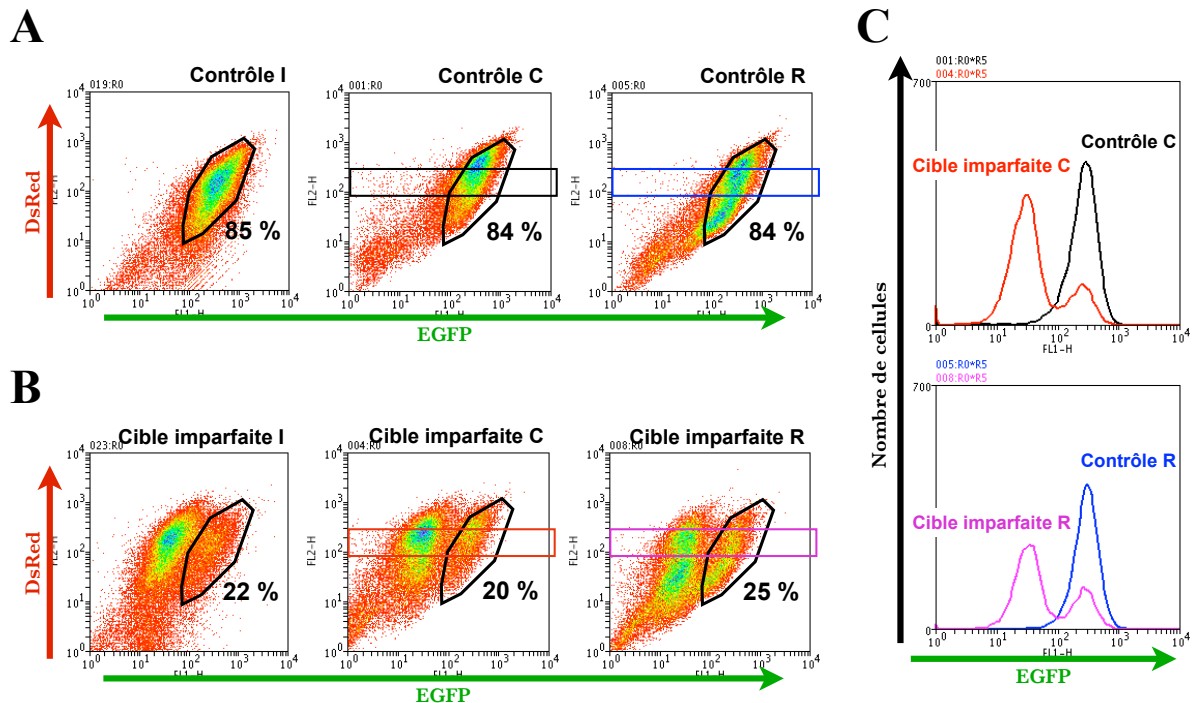


Figure 36, La résistance au silencing en mode miARN est une caractéristique temporaire des cellules. Le clone stable 2miCXCR4-CL6 est utilisé, l'expression des transgènes est induite 32 h avant l'analyse. Les diagrammes et les histogrammes « C » et « R » correspondent aux cellules triées dans l'expérience présentée par la **Figure 35B**, les diagrammes « I » correspondent aux cellules initiales du clone stable non traitées. **A)** Les nuages de points présentent le niveau d'expression des transgènes (EGFP en axe X et DsRed en axe Y) en présence de 2 nM de petit ARN contrôle. Le polygone correspond à la population majoritaire dans l'échantillon initial. Les rectangles dans les diagrammes « Contrôle C » et « Contrôle R » délimitent les cellules analysées dans la **Figure C**. **B)** Les nuages de points montrent le niveau d'expression des transgènes en présence de 2 nM de petit ARN régulateur siCXCR4. Le polygone noir indique la position de la population majoritaire en l'absence de silencing et définit les cellules résistantes au silencing. Le pourcentage des cellules résistantes ainsi déterminé est indiqué. Les rectangles dans les diagrammes « Cible imparfaite C » et « Cible imparfaite R » délimitent les cellules analysées dans la **Figure C**. **C)** Les histogrammes présentent la distribution des cellules en fonction de leur intensité d'EGFP. Seules les cellules sélectionnées par les rectangles dans les dot-plots de la **Figure A et B** sont incluses. La couleur des courbes correspond au rectangle délimitant les cellules pour l'analyse.

Les trois diagrammes « Contrôle » dans la Figure 36A permettent d'apprécier que 7 jours après le tri, l'effet inhibiteur de petit ARN siCXCR4 sur l'expression d'EGFP a presque complètement disparu. On peut cependant remarquer que la position des cellules triées

« C » est située à gauche de celles dans le diagramme contrôle « I » ce qui suggère un léger silencing résiduel. De manière intéressante, une population similaire peut être observée chez des cellules triées « R » ce qui suggère que non seulement les populations « R » et « C » ne restent pas distinctes, mais en encore que le silencing peut être rétabli après le tri chez les cellules « R » qui étaient résistantes au silencing au moment du tri. On peut aussi noter que le profil d'expression n'est pas tout à fait le même entre les deux populations « R » et « C », cette dernière ayant une expression globalement plus forte que la première.

Les profils en réponse à un deuxième test du silencing en mode miARN sont présentés dans la Figure 36B et C. La quantification de la répartition des cellules entre les compétentes (silencing actif) et les résistantes est similaire entre la population de départ et les populations triées (avec un pourcentage de cellules résistantes très légèrement supérieur dans les cellules « R » triées comme « résistantes », 25 % contre 20 %). La séparation des cellules compétentes et résistantes au moment du deuxième silencing chez chaque population « R » ou « C » triée 7 jours auparavant est précisée dans la Figure 36C. Ces histogrammes présentent l'expression de l'EGFP parmi les cellules encadrées par les rectangles rouge et violet (qui délimitent une expression de la DsRed comprise entre 90 et 300). En réponse au deuxième silencing on observe, pour les deux populations « R » et « C », la présence de cellules qui ont un niveau d'expression de l'EGFP identique à celui de la population contrôle (Fig. 36C, courbes « Contrôle »). Ainsi, il existe une population de cellules résistantes au sein de chacune des populations purifiées. Comme observé plus haut, la proportion est légèrement différente entre les deux populations (légèrement plus abondante dans la population initialement résistante). Réciproquement, on observe un silencing efficace dans une majorité des cellules au sein des deux populations, l'amplitude du silencing étant comparable. Clairement le caractère « compétent » ou « résistant » n'est pas transmis de manière stable aux cours des divisions cellulaires (Fig. 36B) et chacune des deux populations peut donner naissance à l'autre. De nouveau, la forme des nuages de points dans ces diagrammes n'est pas identique entre les deux populations, les cellules « compétentes » exprimant des niveaux plus élevés de la construction indicatrice. L'effet le plus marqué est la présence des cellules « faibles expresseuses » au sein de la population triée comme résistante, mais ce caractère n'est pas prédictif de la réponse au petit ARN comme montré dans les diagrammes de la Figure 36B puisque les cellules « faibles expresseuses » sont majoritairement régulés en réponse au petit ARN. Le caractère « résistant » est donc une caractéristique temporaire des cellules, ce qui suggère qu'il

pourrait être dû à l'environnement ou la physiologie des cellules à un moment donné de la culture.

Bilan

En utilisant des clones stables HEK293 Tet-On dont le génome contient les gènes rapporteurs actifs et la technique FACS, nous avons pu étudier le silencing en mode miARN séparément chez les cellules compétentes et les cellules résistantes. Ces études ont montré que les facteurs rendant les cellules résistantes à la régulation en mode miARN ne sont pas permanents durant la progression de la culture. Après une semaine, les cellules qui initialement résistent à la régulation se répartissent en deux populations, la population majeure est sensible au silencing, la population mineure n'y est pas. La même observation est également valable chez les cellules qui répondent initialement à la régulation. Même si la proportion de ces deux populations cellulaires varie entre les expériences, la population régulée par le silencing en mode miARN est toujours nettement supérieure à celle qui n'y répond pas.

Ces résultats suggèrent que les cellules résistantes à la régulation en mode miARN sont en un état spécifique où les facteurs assurant cette régulation sont inhibés. Cet état est temporaire au cours de la croissance cellulaire. Il pourrait être induit par certains facteurs présents dans la culture ou par des signaux intra- ou intercellulaires. Il pourrait être induit aussi par des facteurs associés au cycle cellulaire. Des études ciblant ces éléments sont nécessaires pour caractériser ces cellules « résistantes » au silencing en mode miARN.

II. Cycle cellulaire et régulation par les miARN

L'étude précédente établit que le caractère de résistance ou de compétence au silencing en mode miARN n'est pas transmis de manière stable au cours des divisions cellulaires. Ainsi, le contrôle du silencing en mode miARN relève-t-il de la physiologie cellulaire. Au sein d'une culture cellulaire asynchrone telle que celles que j'utilise, les cellules diffèrent par de nombreux paramètres dont leur position dans le cycle, mais aussi leurs interactions intercellulaires. Ce dernier point est évident dans le cas des cellules HEK293 qui poussent en îlots de cellules épithéliales, mais a priori plus difficile à identifier dans le cas des cellules U2OS. Les analyses en cytométrie donnent accès à d'autres informations que la fluorescence et en particulier à la taille des cellules. Pour caractériser les cellules

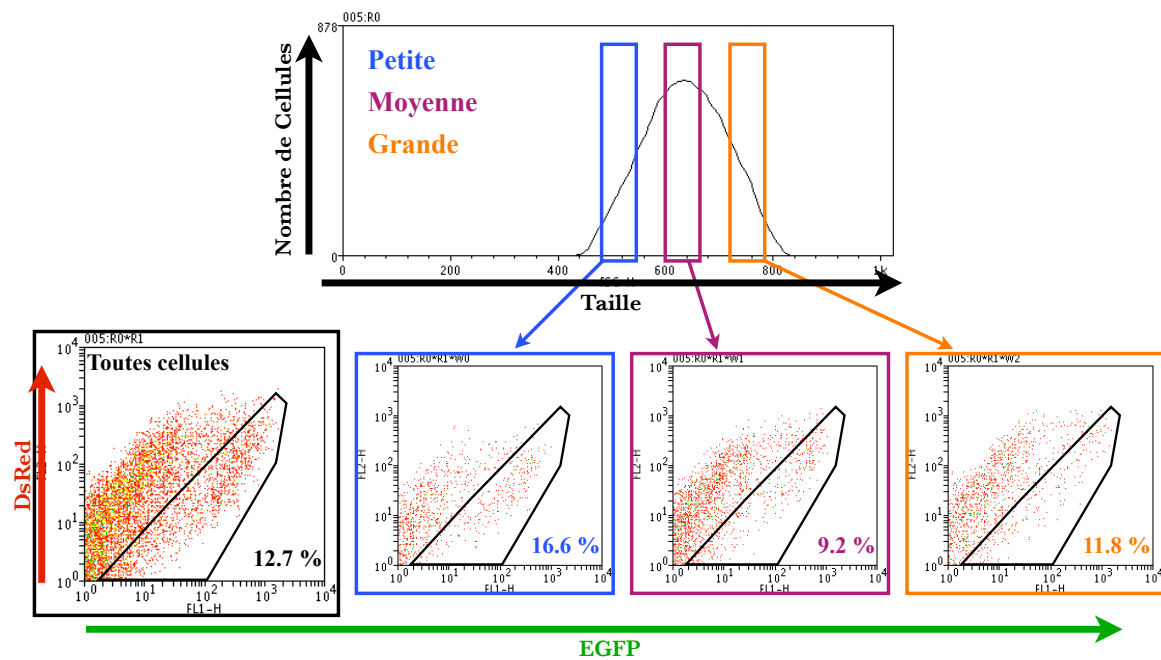
résistantes, j'ai donc tout d'abord étudié si elles différaient de la population globale par leur taille. Dans un deuxième temps j'ai utilisé un marquage de la quantité d'ADN pour analyser par cytométrie la position dans le cycle des cellules.

A. Les cellules résistantes à la régulation en mode miARN sont plus abondantes dans les cellules de petite taille

En plus des mesures de fluorescence, le cytomètre enregistre deux paramètres optiques sur chaque particule qui passe dans la chambre d'analyse. La diffusion vers l'avant (en fait mesuré à un petit angle du faisceau d'excitation ; FSC pour Forward Scatter) est liée à la taille de la particule, plus la particule est grosse plus la diffusion est importante. En fait, la valeur mesurée dépend de nombreux autres paramètres comme le volume du noyau et les propriétés optiques de la cellule, mais au sein d'un type cellulaire, il existe une corrélation entre la taille des cellules et la diffusion vers l'avant (Meyer & Brunsting 1975). La diffusion sur le côté (mesurée à 90°, SSC pour Side Scatter), donne une information sur la surface de la particule et est d'autant plus importante que la surface est irrégulière. La sélection sur le profil de diffusion permet de restreindre l'analyse à des cellules dont la taille et la granulosité correspondent à celles des cellules vivantes et isolées. Les particules avec une valeur FSC trop petite sont probablement les débris cellulaires, celles avec une valeur trop élevée des agrégats cellulaires, tandis qu'une valeur élevée de SSC est un indicateur d'un état physiologique anormal. Des populations cellulaires de différentes tailles peuvent être facilement séparées en sélectionnant sur la valeur de FSC-H (Fig. 37A). L'expression de la construction indicatrice et le profil du silencing en mode miARN peuvent alors être mesurés pour chacune de ces populations. Ces études ont été menées sur les cellules en transfection transitoire afin de pouvoir exploiter les différentes constructions.

Une étude de la relation entre la taille des cellules et la régulation en mode miARN est présentée dans la Figure 37. Les analyses portent sur l'expression de la construction pBiFluo-3miCXCR4 en présence de 2 nM de petit ARN siCXCR4 dans les cellules HEK293 Tet-On. La Figure 37A montre la méthode d'analyse utilisée afin d'aborder ce type d'étude.

A



B

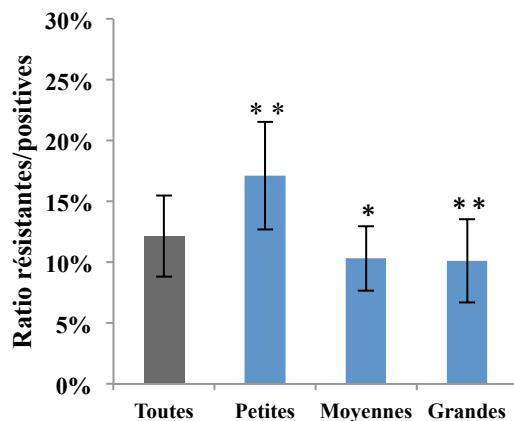


Figure 37, Les cellules résistantes au silencing en mode miARN sont enrichies parmi les cellules de petite taille.

Les données utilisées pour cette analyse ont été obtenues par transfection transitoire de pBiFluo-3miCXCR4 et 2 nM de petit ARN régulateur siCXCR4 dans les cellules HEK293 Tet-On. L'induction de l'expression des gènes rapporteurs a lieu 32 h avant l'analyse par la cytométrie. **A)** Schéma représentatif des analyses évaluant le ratio des cellules résistantes parmi les cellules positives en fonction de leur taille. L'histogramme montre la distribution des cellules en fonction de leur valeur FSC-H (qui reflète en partie la taille d'une cellule). Les trois rectangles de différentes couleurs délimitent des cellules de différente taille, le bleu pour les petites cellules, le violet pour les cellules moyennes et l'orange pour les plus grandes cellules. Les nuages de points correspondant aux différentes populations, ainsi qu'à l'ensemble des cellules sont présentés. Le polygone noir détermine les cellules résistantes (cette détermination a été discutée dans la **Figure 27C**). Le pourcentage des cellules comprises dans le polygone parmi les cellules positives (DsRed > 1) de la sous-population sélectionnée (par l'un des rectangles dans l'histogramme FSC-H) est indiqué. **B)** L'histogramme résume la proportion des cellules résistantes au silencing en mode miARN parmi les cellules positives de la population étudiée. La colonne gris foncé montre cette proportion dans toutes les cellules figurées dans l'histogramme de la **Figure A**. Les 3 colonnes bleues montrent cette proportion dans différentes sous-populations délimitées par les rectangles de la **Figure A** comme indiqués. La différence entre cette proportion de chaque sous-population (chaque colonne bleue) et celle de la totalité des cellules (colonne grise foncée) est validée par un *t-test* ($n = 6$, $p < 0,01$: ** ; $p < 0,05$: *).

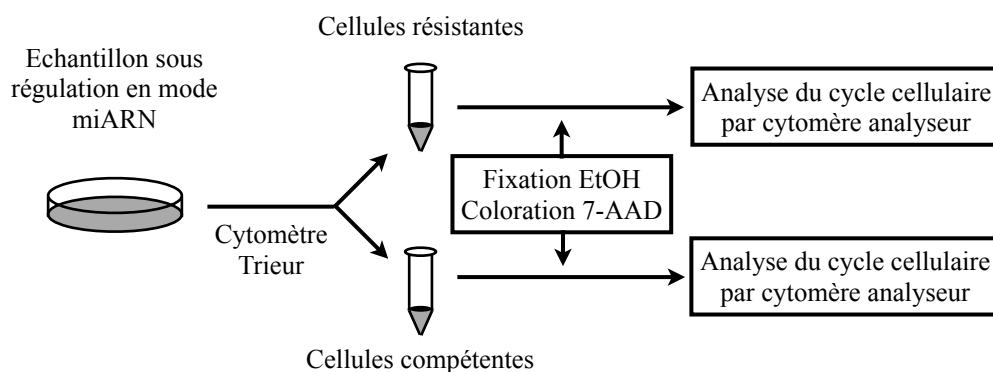
Les résultats obtenus par cette méthode d'exploitation des données indiquent que les cellules résistantes au silencing en mode miARN ne sont pas réparties de manière homogène dans toutes les cellules, elles sont plus abondantes parmi les petites cellules que dans la population générale. Dans la Figure 37B, qui démontre la proportion de cellules résistantes parmi les cellules positives des différentes sous-populations cellulaires, nous voyons que pour la sous-population des cellules de petite taille, la proportion de cellules résistantes au silencing en mode miARN est plus importante et représente plus de 17 % parmi les cellules positives, au lieu de 12 % dans la population de départ. La significativité de cette différence a été testée dans un t-test ($n = 6$, Fig. 37B, $** : p < 0,01$). Par ailleurs, une proportion plus faible de cellules résistantes est observée dans les cellules de taille moyenne et de grande taille (Fig. 37B, $* : p < 0,05$). Les mêmes observations ont été constatées en utilisant la construction indicatrice pBiFluo-3milet7 et le petit ARN silet-7b, les figures de ces analyses sont présentées dans l'annexe.

Toutefois, il ne s'agit pas d'une relation directe puisque des cellules résistantes sont aussi présentes dans la sous-population de plus grande taille et que même dans la sous-population de petite taille, l'abondance ne dépasse pas 18 %. Généralement, les cellules de petite taille sont des cellules qui viennent de se diviser, elles sont donc en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Même si plusieurs facteurs peuvent influencer sur la taille indépendamment de la progression du cycle, ces résultats suggèrent que le cycle cellulaire pourrait influencer sur l'activité du silencing en mode miARN.

B. Les cellules résistantes à la régulation en mode miARN sont moins fréquentes parmi les cellules en phase S-G2/M

L'observation précédente (rôle de la taille des cellules dans la régulation du silencing en mode miARN) suggère un rôle du cycle cellulaire dans le silencing en mode miARN. Une telle hypothèse est aussi compatible avec l'observation que la résistance n'est pas un phénotype stable au cours des divisions cellulaires. De fait, une difficulté pour faire jouer un rôle central au cycle cellulaire vient précisément du caractère transitoire de la position dans le cycle ; à supposer que dans une phase du cycle le silencing en mode miARN soit inopérant, comment expliquer que ceci puisse se manifester par une absence complète de silencing à travers une mesure qui s'étale sur 24h ?

A



B

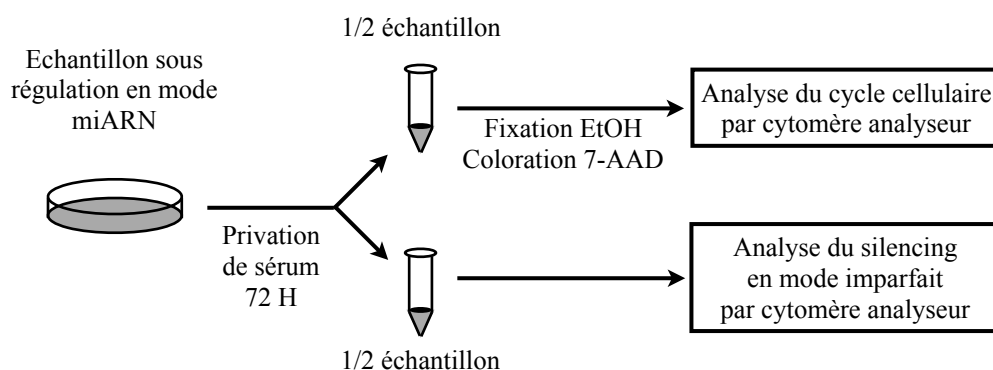


Figure 38, Schéma des deux stratégies envisageables pour les études de l'impact du cycle cellulaire sur le silencing en mode miARN.

Pour essayer de conforter ou d'infirmer le rôle du cycle cellulaire dans le silencing en mode miARN, deux grandes stratégies sont envisageables (Fig. 38). La première stratégie consiste à analyser la position dans le cycle des cellules résistantes et compétentes et non

plus seulement la taille (Fig. 38A). En principe la cytométrie est bien adaptée à ce genre d'étude et l'on peut analyser la position dans le cycle à l'aide de plusieurs outils : le contenu en ADN ou l'expression de marqueurs spécifiques de chaque phase du cycle. Toutefois, ces types de marquages demandent la fixation et la perméabilisation des cellules, ce qui n'est pas directement compatible avec notre système expérimental car ces traitements conduisent à une fuite des protéines fluorescentes dans le milieu extracellulaire. Il est donc nécessaire de découpler les deux analyses celle du silencing et celle du cycle, ce qui peut être réalisé si l'on utilise un trieur pour purifier des populations de cellules compétentes et résistantes. Une deuxième stratégie est de contrôler la progression des cellules dans le cycle cellulaire de manière à mesurer le silencing dans des populations synchrones (Fig. 38B). La première approche nous donnera une vision instantanée de la distribution des différentes populations cellulaires (en fonction de leur réponse à la régulation en mode miARN) dans le cycle, la deuxième approche fournira des informations sur la mise en place du silencing en mode miARN dans des cellules en différentes phases du cycle cellulaire.

Après avoir exploré les différents marquages possibles des cellules au cours du cycle, nous avons choisi le marquage de l'ADN surtout du fait de son pouvoir d'analyse puisque toutes les cellules de l'échantillon sont en principe analysables pour leur contenu en ADN. Le colorant de l'ADN utilisé est le 7-AAD (7-Amino-Actinomycin D). Ce colorant fluoresce à un niveau important entre 630 et 700 nm (détectable par le canal FL3 du cytomètre), le spectre fluorescent de DsRed s'étend en partie dans cette fenêtre, mais comme la fixation et la perméabilisation des cellules par l'éthanol fait disparaître la DsRed et l'EGFP, les signaux résiduels sont faibles et perturbent peu l'analyse du 7-AAD. Ceci est illustré dans la Figure 39, en l'absence de 7-AAD aucune fluorescence n'est détectable dans le canal FL3.

Les analyses du cycle sont effectuées en fonction du paramètre FL3-A. Le cytomètre peut enregistrer 3 données dans un canal de détection. Au cours du passage d'une cellule devant le faisceau du laser d'excitation, le taux de sa fluorescence émise est enregistrée sous forme d'un pic par le cytomètre. Trois variables sont nécessaires pour décrire le pic : sa hauteur (H) qui indique le taux maximal de sa fluorescence, sa largeur (W) qui montre le temps de son passage et sa surface (A) qui chiffre la somme de son intensité fluorescente.

L'analyse du cycle cellulaire utilise la variable A car la surface du pic reflète la quantité totale d'ADN à l'intérieur d'une cellule et ce indépendamment de sa taille.

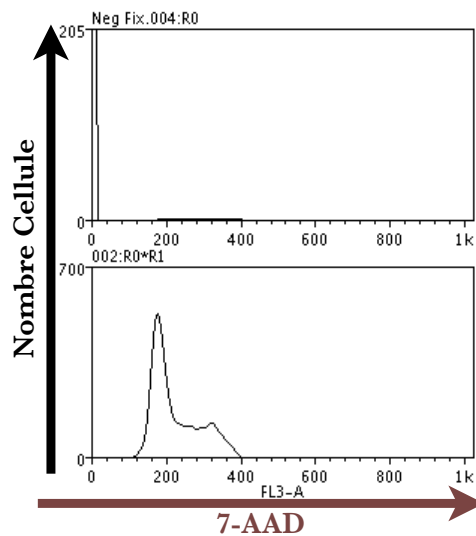


Figure 39, Validation de la coloration d'ADN par 7-AAD. Les cellules HEK293 Tet-On sont transfectées par le plasmide rapporteur pBiFluo-3miCXCR4, l'expression des gènes rapporteurs est induite 32 h avant la fixation et l'analyse par la cytométrie. Les cellules fixées par EtOH à froid sont incubées dans le PBS sans ou avec 7-AAD afin de marquer leur contenu en ADN, elles sont ensuite analysées par la cytométrie en utilisant la variable A (indiquant la somme de l'intensité fluorescente d'une cellules) du canal de détection FL3 (FL3-A).

La première analyse a eu pour but de vérifier si les cellules résistantes au silencing en mode miARN sont enrichies en phase G0/G1 comme cela était suggéré par les données précédentes sur la taille des cellules. Le schéma de l'expérience est présenté sur la Figure 38A. Le silencing en mode miARN est mis en place par 2 nM de petit ARN siCXCR4 sur l'expression du plasmide pBiFluo-3miCXCR4 dans une transfection transitoire des cellules HEK293 Tet-On. Les cellules sont ensuite triées en fonction de leur fluorescence et donc de leur réponse au silencing. Le nuage de points « Trieur » dans la Figure 40A montre la sélection entre les cellules compétentes et les cellules résistantes (les cellules encadrées par la région « C » sont collectées en tant que cellules compétentes ; celles délimitées par la région « R » sont définies comme cellules résistantes). Comme discuté auparavant, les données acquises par le cytomètre trieur se présentent différemment de celles obtenues par un cytomètre analyseur (Fig. 40A) du fait des caractéristiques de l'appareil et des réglages utilisés. De plus le rendu de la densité de cellules est différent. A titre de comparaison, la région délimitée en pointillée dans le nuage de point trieur est approximativement comparable à celle de nos analyses en basse sensibilité. En particulier on peut observer l'existence de deux populations, l'une avec un silencing efficace et l'autre pratiquement sans silencing. Les deux populations des cellules ainsi collectées sont fixées dans l'éthanol froid, puis l'ADN est coloré par le 7-AAD et leur position dans le cycle définie par la mesure de leur contenu en ADN.

RESULTATS

Facteurs affectant la régulation en mode miARN

Régulation miARN et cycle cellulaire

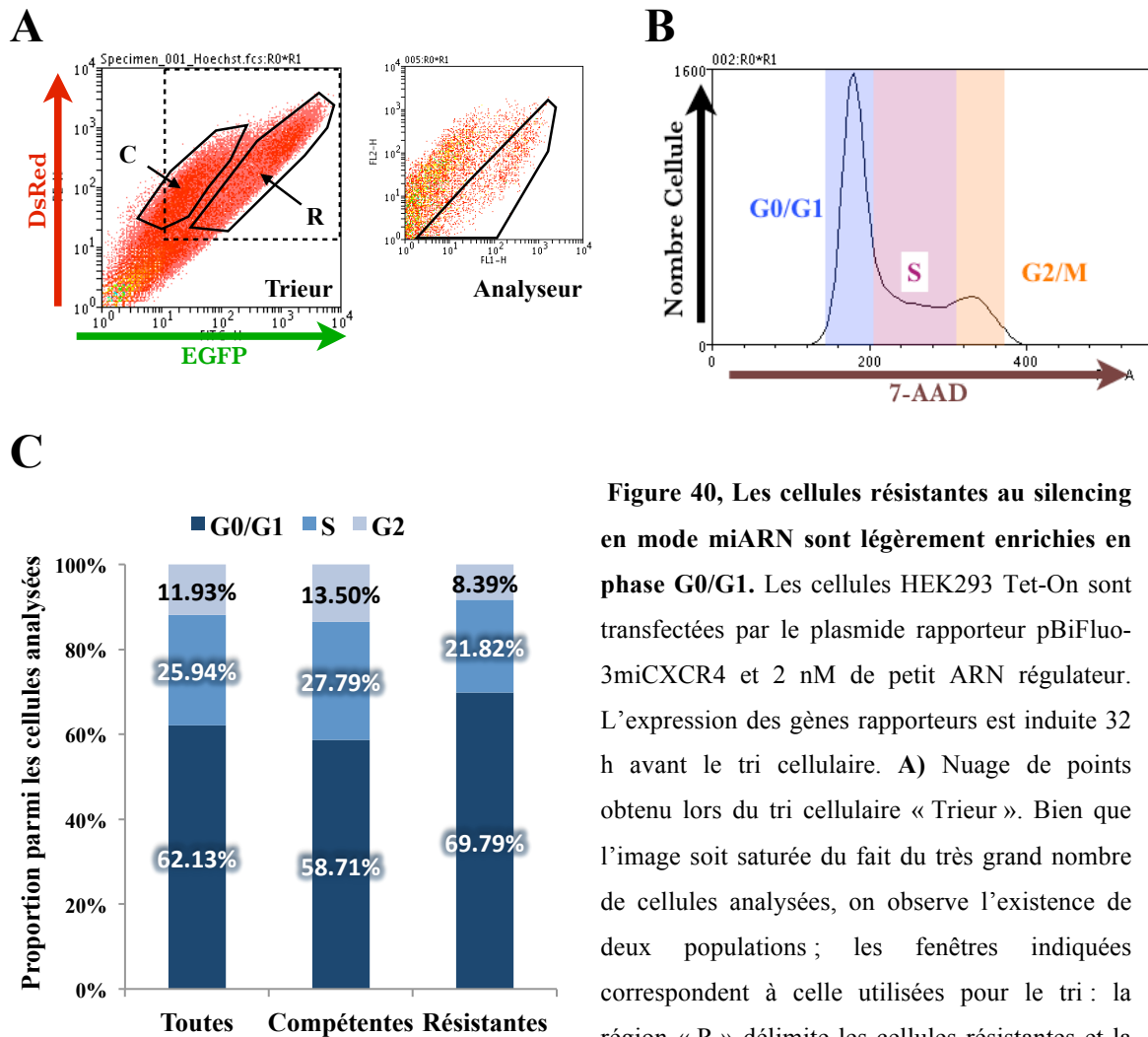


Figure 40, Les cellules résistantes au silencing en mode miARN sont légèrement enrichies en phase G0/G1. Les cellules HEK293 Tet-On sont transfectées par le plasmide rapporteur pBiFluo-3miCXC4 et 2 nM de petit ARN régulateur. L'expression des gènes rapporteurs est induite 32 h avant le tri cellulaire. **A)** Nuage de points obtenu lors du tri cellulaire « Trieur ». Bien que l'image soit saturée du fait du très grand nombre de cellules analysées, on observe l'existence de deux populations ; les fenêtres indiquées correspondent à celle utilisées pour le tri : la région « R » délimite les cellules résistantes et la

région « C » définit les cellules compétentes. La présentation du nuage de points dans la région pointillée dans le dot-plot « Trieur » correspond à celle du nuage de points obtenu au cytomètre analyseur réglé en basse sensibilité, comme montré dans le dot-plot « Analyseur ». **B)** L'histogramme de fluorescence du 7-AAD illustre la détermination des différentes phases du cycle cellulaire. Il montre la distribution des cellules en fonction de leur valeur FL3-A qui reflète la quantité d'ADN d'une cellule. La région bleue correspond aux cellules en phase G0/G1, la région rose en phase S et la région orange en phase G2/M. **C)** Les deux sous-populations cellulaires collectées par le tri montré dans la **Figure A** (« Compétentes » et « Résistantes ») et les cellules non triées du même échantillon cellulaire (« Toutes ») sont analysés pour leur contenu en ADN après coloration par le 7-AAD. Les données obtenues par la cytométrie sont analysées en suivant la méthode illustrée dans la **Figure B** afin d'évaluer la répartition au sein du cycle cellulaire des différentes sous-populations de cellules (« Compétentes » et « Résistantes »). Les blocs bleus foncés indiquent la proportion de cellules en phase G0/G1 sur l'ensemble des cellules analysées (de la même préparation cellulaire), les blocs bleus moyens pour celle en phase S et les blocs bleus clairs pour celles en phase G2/M.

La Figure 40B présente un exemple d'analyse du contenu en ADN à travers l'histogramme FL3-A, avec une définition classique des trois phases identifiables. Le premier pic de la

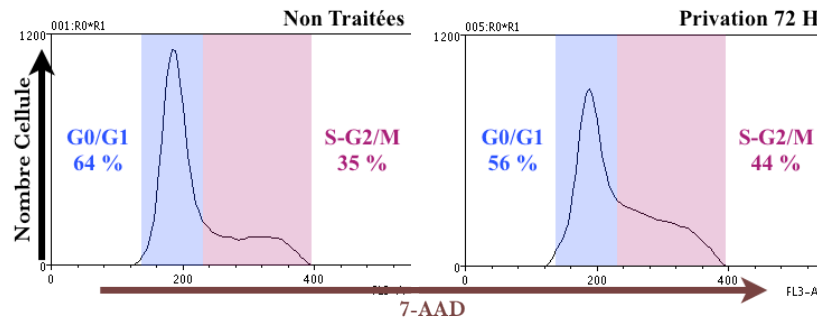
courbe de cet histogramme dans la région bleue correspond aux cellules en phase G0/G1 ; le petit pic dans la région orange correspond aux cellules en phase G2/M, sa valeur du FL3-A est environ le double de celle du pic G0/G1, indiquant une duplication complète de l'ADN G0/G1 ; la partie intermédiaire dans la région violette représente les cellules en phase S. La Figure 40C compare la répartition des cellules dans ces 3 phases déterminées à partir des histogrammes FL3A. Trois répartitions sont présentées, celle de la population de départ (« Toutes »), celle des cellules « Compétentes » pour le silencing et celle des cellules « Résistantes ». On peut noter que chez les cellules compétentes le pourcentage de cellules en phase G0/G1 diminue légèrement, de 62 à 59 %, tandis que chez les cellules résistantes au silencing ce pourcentage augmente de 62 à 70 % (Fig. 40C, blocs bleus foncés). La distribution dans les autres phases du cycle, S et G2/M, compense les variations de celle en G1 et augmente pour les cellules compétentes ou diminue pour les cellules résistantes.

Ces données montrent que les cellules résistantes sont un peu plus nombreuses dans les cellules en phase G0/G1. Comme cette analyse a été faite sur des cellules en cycle, on peut interpréter ce résultat de deux manières différentes. La première est que le silencing fonctionne moins bien chez les cellules en G0/G1. La deuxième est que puisque la mesure du silencing n'est pas instantanée (voir le **Bilan**), ce que l'on observe dans les cellules en G0/G1 est en fait l'effet tardif de ce qui a eu lieu initialement dans la phase G2/M.

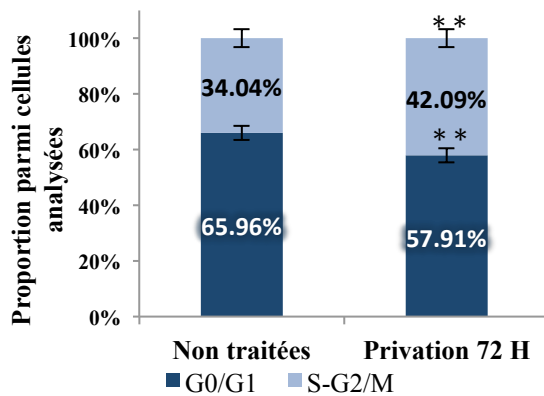
Pour répondre à cette question j'ai cherché à synchroniser les cellules de manière à ce qu'elles s'accumulent dans l'un des phases du cycle afin de tester directement le lien entre le cycle et le silencing. Dans une première approche, j'ai utilisé la privation de sérum pour bloquer les cellules HEK293 Tet-On, a priori en phase G0/G1. Cependant, après plusieurs essais, nous constatons que cette lignée répond à ce traitement d'une manière particulière : après 3 jours de privation de sérum, la proportion des cellules en phase G0/G1 diminue, les cellules s'accumulant dans les phases S et G2/M (Fig. 41A). Le schéma expérimental est présenté dans la Figure 38B. Le silencing en mode miARN est induit par 2 nM de petit ARN siCXCR4 sur l'EGFP exprimé par pBiFluo-3miCXCR4. 48 h après la transfection, les cellules sont lavées avec du PBS afin d'enlever le sérum puis elles sont remises en culture dans un milieu DMEM classique dépourvu du sérum pendant 72 h. A la fin de privation de sérum, chaque échantillon est divisé en 2 parties, une partie est analysée pour le silencing en mode miARN, le ratio des cellules résistantes au silencing est calculé par

rapport aux cellules positives ; l'autre partie est sujette à une analyse parallèle contrôlant leur distribution dans le cycle cellulaire via une coloration 7-AAD.

A



B



C

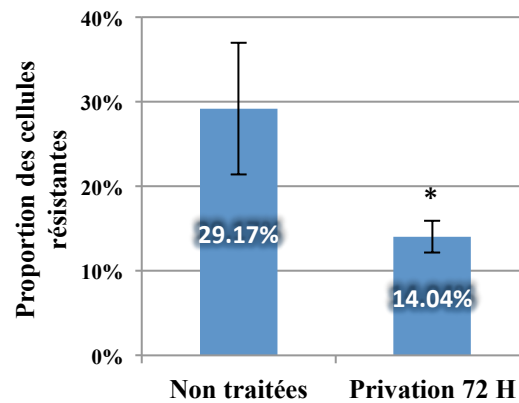


Figure 41, La proportion des cellules résistantes au silencing en mode miARN diminue quand les cellules sont enrichies en phase S ou G2/M. Les cellules HEK293 Tet-On sont transfectées par le plasmide rapporteur pBiFluo-3miCXC4 avec 2 nM de petit ARN régulateur siCXC4. La fixation et l'analyse par la cytométrie a lieu 72 h après l'enlèvement du sérum. Les cellules non traitées sont fixées et analysées 32 h après l'induction de l'expression. **A)** Un exemple d'histogramme évaluant la répartition des cellules au sein du cycle cellulaire avant et après la privation de sérum pendant 72 h dans une analyse en cytométrie avec la coloration 7-AAD du contenu en ADN. Les cellules dont FL3-A correspond aux valeurs encadrées par la région bleue sont considérées en phase G0/G1, celles délimitées par la région rose en phase S-G2/M. Le pourcentage des cellules en chaque phase est indiqué pour les cellules non traitées ou les cellules privées de sérum pendant 72 h. **B)** Histogramme combinant 6 jeux de données de cycle cellulaire comme indiqué dans la **Figure A**. Les blocs bleus foncés représentent la proportion des cellules en phase G0/G1, les blocs bleus clairs celle des cellules en phase S-G2/M. La différence entre les cellules privées de sérum et les cellules non traitées est validée par un *t-test* ($n = 6$, $p < 0,01$: **). **C)** Histogramme résumant 3 jeux de données sur l'analyse en parallèle de l'efficacité du silencing en mode miARN chez les différentes populations cellulaire (« Non traitées » ou « Privation 72 H »). Les colonnes montrent le pourcentage de cellules résistantes au silencing parmi les cellules positives (DsRed > 1). La différence entre les cellules privées de sérum et les cellules non traitées est validée par un *t-test* ($n = 3$, $p < 0,05$: *).

La Figure 41A montre l'impact de la privation de sérum sur le cycle cellulaire chez les cellules HEK293 Tet-On. En comparant deux histogrammes représentatifs de FL3-A, une augmentation des cellules en phase S et G2/M est clairement visible chez les cellules privées de sérum. On note également que la limite entre le pic du G2/M et le bloc de phase S disparaît dans les cellules traitées, suggérant un effet particulièrement important sur la phase S (la forme inhabituelle de la distribution des cellules fait que les modèles classiques ne sont plus adaptés pour quantifier séparément les phases S et G2/M).

Ces résultats sont synthétisés dans la Figure 41B, ils mettent en évidence que la privation de sérum pendant 3 jours des cellules HEK293 Tet-On diminue significativement la proportion des cellules en phase G0/G1 par rapport au contrôle maintenu en présence de sérum (**, $p < 0.01$). La proportion des cellules en phase S-G2/M augmente en complément.

L'analyse de l'efficacité du silencing a été menée en parallèle sur les cellules privées de sérum et met en évidence une nette diminution de la population résistante (Fig. 41C). L'analyse des données utilise la même méthode que dans la Figure 37. On constate une chute importante de la proportion de cellules résistantes après privation de sérum (de l'ordre de 30 % chez les cellules contrôle, elle baisse à environ 15 % après privation). Ainsi la moitié des cellules résistantes au silencing deviennent compétentes suite à la privation de sérum alors que la proportion des cellules en phase G0/G1 ne change que de 66 à 58 %. Il faut noter que cette expérience donne un pourcentage de cellules résistantes dans la population contrôle plus élevée que la moyenne, ce qui reflète probablement le changement des conditions de culture cellulaire (ces expériences ont été faites avec des cellules récemment décongelées).

L'ensemble de ces observations suggère un lien entre le cycle cellulaire et la résistance au silencing en mode miARN. Plus spécifiquement, les cellules résistantes sont plus nombreuses en phase G0/G1, comme l'indiquent d'une part l'observation que dans une population en cycle, les cellules résistantes sont plus abondantes dans les cellules en G0/G1 et d'autre part que lorsque les cellules s'accumulent en S et G2/M la proportion de cellules résistantes diminue.

Bilan

Dans le cadre des expériences en transfection transitoire dans les cellules HEK293 Tet-On, nos résultats montrent que les cellules résistantes au silencing en mode miARN diffèrent de la population générale de plusieurs manières. L'observation initiale est que ces cellules sont plus abondantes parmi les cellules de petite taille ce qui pourrait refléter un lien avec le cycle cellulaire. Dans ce cas on s'attendrait à ce que les cellules résistantes soient en phase G0/G1. Les études faites sur le cycle sont en accord avec cette hypothèse puisque les cellules résistantes sont un peu plus fréquentes dans cette phase qu'en S ou G2/M. De plus, dans des conditions de privation de sérum, qui diminuent la population en G0/G1, on observe une forte diminution du pourcentage de cellules résistantes.

Bien que ces résultats soient cohérents entre eux, leur interprétation est néanmoins difficile. En effet, le lien observé avec le cycle n'est qu'une association préférentielle, on détecte des cellules résistantes dans toutes les phases du cycle, et même en G0/G1, les cellules résistantes ne sont qu'une minorité. Ce dernier point pourrait être facilement expliqué par l'idée que le silencing n'est pas actif que dans un secteur spécifique de G0/G1, par exemple en début de G1. Mais ce type d'explication est en contradiction avec la détection de cellules résistantes dans les autres phases du cycle et en particulier en G2/M. De plus, la mesure du silencing n'est pas une mesure instantanée et l'accumulation des protéines fluorescentes a lieu sur une échelle de temps qui est du même ordre que celle du cycle cellulaire (32 h d'induction, dont les 12 dernières heures sont probablement les plus importantes en terme de production de protéine). A ce stade il semble donc plus probable que la résistance ne soit qu'indirectement liée au cycle, les cellules résistantes étant dans un état physiologique qui est plus fréquent en G0/G1 que dans les autres phases.

III. Activité des miARN est liée au réseau mitochondrial

En collaboration avec l'équipe de Dr. Dominique Weil, nous avons mis en évidence que la régulation en mode miARN dépend du bon fonctionnement du réseau mitochondrial. Si l'activité des mitochondries est bloquée par un réactif chimique CCCP (Carbonyl Cyanide *p*-ChloroPhenylhydrazine), nous observons une diminution marquée de l'efficacité du silencing en mode miARN. L'observation initiale de l'équipe de Dr. Weil est que les foyers cytoplasmiques P-bodies s'associent avec les mitochondries. En utilisant les

techniques microscopiques (microscopie fluorescente et vidéo-microscopie), nous avons mise en évidence que les P-bodies établissent des contacts directs et hautement dynamiques avec les mitochondries. Ces contacts ne sont pas significativement altérés par le blocage du fonctionnement du réseau mitochondrial. Cependant, vue que les P-bodies sont impliqués dans les régulations par les petits ARN, nous avons étudié l'importance du réseau mitochondrial durant le silencing. Les résultats obtenus par notre système expérimental indiquent que les membranes mitochondriales jouent un rôle important pendant la formation des complexes RISC, tandis qu'une fois les complexes RISC sont formés, la perturbation des mitochondries n'a pas d'effet sur le silencing. Ces résultats sont présentés dans en détail dans l'article joint ci-après « **Mitochondria Associate with P-bodies and Modulate MicroRNA-mediated RNA Interference** ».

Mitochondria Associate with P-bodies and Modulate MicroRNA-mediated RNA Interference^{*,[5]}

Received for publication, March 16, 2011, and in revised form, May 3, 2011. Published, JBC Papers in Press, May 16, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.240259

Lue Huang^{‡1,2}, Stéphanie Mollet^{§1,3}, Sylvie Souquere[¶], Florence Le Roy^{§4}, Michèle Ernoult-Lange[§], Gérard Pierron[¶], François Dautry[‡], and Dominique Weil^{§5}

From the [§]UPMC University Paris 06, CNRS-FRE 3402, 9 quai Saint Bernard, 75005 Paris, the [‡]LBPA, CNRS, Ecole Normale Supérieure de Cachan, 94230 Cachan, and the [¶]CNRS UMR 8122, Institut Gustave Roussy, 39 Rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, France

P-bodies are cytoplasmic granules that are linked to mRNA decay, mRNA storage, and RNA interference (RNAi). They are known to interact with stress granules in stressed cells, and with late endosomes. Here, we report that P-bodies also interact with mitochondria, as previously described for P-body-related granules in germ cells. The interaction is dynamic, as a large majority of P-bodies contacts mitochondria at least once within a 3-min interval, and for about 18 s. This association requires an intact microtubule network. The depletion of P-bodies does not seem to affect mitochondria, nor the mitochondrial activity to be required for their contacts with P-bodies. However, inactivation of mitochondria leads to a strong decrease of miRNA-mediated RNAi efficiency, and to a lesser extent of siRNA-mediated RNAi. The defect occurs during the assembly of active RISC and is associated with a specific delocalization of endogenous Ago2 from P-bodies. Our study reveals the possible involvement of RNAi defect in pathologies involving mitochondrial deficiencies.

P-bodies are ribonucleoprotein granules present in the cytoplasm of eukaryotic cells. They contain all proteins involved in the 5' to 3' mRNA degradation pathway, such as the decapping enzyme Dcp2, its enhancers Dcp1, Lsm1–7, Edc3, Hedls/Ge1, and the exonuclease Xrn1. This list extends to factors involved in specific degradation pathways, such as RNAi, NMD, and NGD (1, 2). They also contain proteins involved in translational repression, such as eIF4ET, Rck/p54/Dhh1, CPEB1, and the RISC complex. Some of the latter proteins also play a role in mRNA degradation, in particular Rck/p54/Dhh1, which is known as an enhancer of decapping, and the RISC complex when it is guided by a siRNA. Such catalogue of components indicates that P-bodies participate in these two aspects of mRNA metabolism. In addition, P-bodies increase in number and size when free untranslated mRNA accumulates. In mammals, this is observed when degradation is compromised by

Xrn1 silencing (3) or when polysomes are disrupted with puromycin or arsenite (4). Taken together, these data support a role of P-bodies in mRNA degradation, mRNA storage, and RNA interference. Yet, their exact participation is unclear, as none of these functions is markedly affected in cells where P-bodies have been depleted (5–9).

Live cell observations show that the number of P-bodies is quite stable over hours, although occasional formation of new P-bodies or fusions of pre-existing ones are observed (10).⁶ Nevertheless, P-bodies are dynamic structures within the cytoplasm. Most of the time, they exhibit chaotic movements within a spatially confined area of the cytoplasm. Occasionally, they also perform sudden directional movements over a few micrometers, which, in human U2OS cells, take place along microtubule tracks, at a velocity of 0.5 to 1 $\mu\text{m/s}$ (11). In addition, many P-body components actively traffic in and out of P-bodies. Photobleaching and photoactivation experiments show a continuous shuttling of Dcp1a, Dcp1b, Lsm6, eIF4E, eIF4ET, and TTP proteins between P-bodies and cytosol. This is not observed for other components such as Dcp2, GW182 (TNRC6A), and Ago2 (11–14). Moreover, P-bodies not only uptake mRNA for degradation or storage, but also release stored mRNA when translation resumes, as shown in yeast and mammalian cells (15, 16). Therefore, despite their apparent stability, P-bodies are dynamic granules that actively exchange molecules with their environment.

P-bodies have been shown to interact with other cytoplasmic organelles. In stressed cells, we and others have shown that P-bodies establish contacts with another type of ribonucleoprotein granule, called stress granules (4, 13). These granules form following stresses that strongly repress translation. They contain a fraction of the arrested mRNAs, associated with translation initiation factors, the small ribosomal subunit, and various RNA-binding proteins (17, 18). It was proposed that the contacts between stress granules and P-bodies serve the transfer of mRNPs from stress granules to P-bodies for triggering their degradation (4, 13). In fact, these contacts are close enough for such a transfer, as observed in electron microscopy (18). However, the pool of mRNA transiting through stress granules is not particularly unstable (19). Therefore the nature of the exchange between the two types of granules, and its significance, are still unknown.

In addition, interactions between P-bodies and late endosomes or multivesicular bodies have been reported in *Drosophila*

^{*} This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Association pour la Recherche contre le Cancer, the Agence Nationale pour la Recherche, and the Ligue Nationale contre le Cancer.

^[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1 and S2 and Videos S1–S6.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur.

³ Supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur.

⁴ Supported by the Fondation pour la Recherche Médicale.

⁵ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-1-4427-6442; Fax: 33-1-4427-6487; E-mail: dominique.weil@upmc.fr.

⁶ S. Mollet and D. Weil, unpublished observations.

ila and mammalian cells (20, 21). Mutations blocking multivesicular body formation or multivesicular body turnover inhibit or stimulate silencing, respectively. As GW182 is highly enriched at the membrane of these vesicles, the authors proposed that miRISC loading or recycling at these membranes could be required for efficient RNAi. Finally, it was recently reported that specific miRNAs⁷ were enriched along with the Ago2 protein in mitochondria purified from rat and mouse liver (22, 23). Most of the potential targets of these miRNAs were encoding non-mitochondrial proteins, raising the possibility that the mitochondria are a reservoir for specific miRNAs involved in the regulation of general cellular functions. In fact, whereas the assembly of active RISC complexes has been followed *in vitro*, enabling the identification of a RISC loading complex (24), the details of the *in vivo* process are poorly known. Fluorescence correlation spectroscopy has indicated that RISC assembly takes place in the cytoplasm within a few hours after the microinjection of si- or miRNA, but could not allow a precise localization (25).

Here, we report that P-bodies establish frequent and prolonged contacts with mitochondria. Disrupting P-bodies does not seem to affect mitochondrion morphology and function. However, disturbing mitochondrial activity strongly represses a P-body-associated function, silencing by small RNAs. Our data indicate that the defect occurs during RISC assembly and correlates with a decreased accumulation of Ago2 in P-bodies.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—Epithelioid carcinoma HeLa cells, human embryonic kidney 293, and HEK 293 Tet-On Advanced cells (Clontech) were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, and human epithelial retina RPE-1 cells in DMEM/F-12 with 10% fetal calf serum. Human umbilical vein endothelial cells (a kind gift of Georges Uzan, IAL, Villejuif, France) were maintained in Endothelial Growth Media-2 (Lonza France) supplemented with 5% fetal calf serum, 0.4% hFGF-B, 0.1% VEGF, 0.4% insulin-like growth factor, 0.1% R3-insulin-like growth factor-1, and 0.1% hEGF (Lonza France) (26), and analyzed at passage 8. Mitochondrial staining was achieved by culture in the presence of 20 μ M CMX Ros Mito-Tracker (Molecular Probes) for 30 min at 37 °C.

To measure the mitochondrial transmembrane potential, trypsinized cells were incubated with 40 nM 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide for 15 min at 37 °C and analyzed by flow cytometry. Vinblastine (Sigma) was used at 10 μ M for a total of 90 min, arsenite (Sigma) at 0.5 mM for 30 min, and CCCP (Sigma) at 20 μ M for the indicated period of time. Cellular ATP was measured in duplicates using the ATP somatic cell assay kit (Sigma) and normalized by the number of cells.

Transfection—For microscopy studies, transient transfections were performed with 3 μ g of plasmid DNA/60-mm diameter dish using a standard calcium phosphate procedure. For silencing studies, transfections were performed in 12-well plates, with 0.5 μ g of plasmid and the indicated concentration

of siRNA/well using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Induction of the reporter construct was achieved by adding doxycycline at 1 μ g/ml. Cells were analyzed by flow cytometry 24 h after the addition of CCCP, unless otherwise indicated (Fig. 7A). Luciferase assays were performed in 24-well plates transfected with 25 ng of *Renilla* and firefly expression vectors, using the dual luciferase assay (Promega).

Plasmids and siRNAs—RFP-p54 contains the full open reading frame of human Rck/p54 (4). MtGFP was a kind gift of Rosario Rizutto (University of Ferrara, Italy) (27). The bidirectional reporter construct pBiFluo was created by inserting the EGFP and the DsRed express cDNAs (Clontech) on both sides of the Tet-regulated bidirectional promoter (Clontech), with a linker allowing for the introduction of regulatory sequences in the 3' UTR of EGFP. pBiFluo-silet7, pBiFluo-3milet7, and pBiFluo-2CXCR4 were obtained by inserting the corresponding binding sites for let-7 and CXCR4 (28), respectively. *Renilla* silet7 and 3milet7 constructs were kindly provided by W. Filipowicz (29).

Rck/p54, CPEB1, and Globin siRNAs were previously described (si-p54, si-CPEB1.2, and si-Glo.1 in Ref. 7). Let-7b (5'-UGA GGU AGU AGG UUG UGU GGdT dT-3') and CXCR4 (5'-UGU UAG CUG GAG UGA AAA CdTdT-3') siRNAs were purchased from MWG, and pre-milet-7b (5'-CGG GGU GAG GUA GUA GGU UGU GUG GUU UCA GGG CAG UGA UGU UGC CCC UCG GAA GAU AAC UAU ACA ACC UAC UGC CUU CCC UG-3') from Ambion.

Immunofluorescence—Cells grown on glass coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min, and permeabilized in acetone at -20 °C for 10 min. After rehydration, cells were incubated with the primary antibody for 1 h, rinsed with PBS, incubated with the secondary antibody for 30 min, and rinsed with PBS, all steps were performed at room temperature. Slides were mounted in Citifluor (Citifluor, UK).

Rabbit polyclonal anti-p54 and mouse monoclonal anti-Ge1 antibodies were purchased from Bethyl Laboratories Inc. and Santa Cruz, respectively. Mouse monoclonal anti-Ago2 was a kind gift of Gunter Meister (MPIB, Germany) (30). Secondary antibodies conjugated to TRITC and Cy2 were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories.

Microscopy—Standard microscopy was performed on a Leica DMR microscope (Leica, Heidelberg, Germany) using a $\times 63$ 1.32 oil immersion objective. Photographs were taken using a Micromax CCD camera (Princeton Instruments) driven by Metamorph software. Confocal images were obtained on a Leica TCS-NT/SP1 inverted confocal laser-scanning microscope (Leica, Heidelberg, Germany) using an Apochromat $\times 63$ 1.32 oil immersion objective. Fluorescence signals were acquired in 0.16- μ m optical sections using Leica software. All images were processed using Adobe Photoshop software. For signal quantification, fluorescence was measured simultaneously for Ago2 and Rck/p54, or Ge1 and Rck/p54, along lines drawn across individual P-bodies using Metamorph software. Their enrichment in the P-body was measured as the difference between the maximal fluorescence in the P-body and the fluorescence in the surrounding cytoplasm.

For video microscopy, cells were grown on glass coverslips and mounted in a POC chamber system with 2 ml of culture medium maintained at 37 °C and 5% CO₂. Cells were observed

⁷ The abbreviations used are: miRNA, microRNA; mRNP, messenger Ribonucleoprotein; CCCP, carbonyl cyanide *p*-chlorophenylhydrazone; mtGFP, mitochondrial GFP; TRITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate.

on a Zeiss inverted microscope Axiovert (Carl Zeiss SAS, France) equipped with a DG4 Lambda switcher (Sutter Instrument) and a CoolSNAP HQ camera (Roper Scientific), driven by Metamorph software. Timed series were acquired using a $\times 63$ 1.32 oil immersion objective.

For electron microscopy, Epon and Lowicryl K4M (Chemische Werke Lowi, Waldkraiburg, Germany) embedding and immunolocalization of proteins were performed as described previously (18). Ultrathin sections were analyzed with a FEI Tecnai Spirit. Digital images were taken with a SIS Megaview III CCD camera.

Flow Cytometry—Transfected HEK 293 Tet-On Advanced cells were washed once with PBS and collected in 400 μ l/well of PBS supplemented with 15% enzyme-free Cell Dissociation Buffer (Invitrogen). Cytometry was performed with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) using FL1 and FL2 to measure EGFP and DsRed fluorescence, respectively. For each sample, 40,000 to 100,000 cells were analyzed. Data were analyzed with the Weasel software (version 2, Walter and Eliza Hall Institute). Silencing values were defined by the change in the mean EGFP fluorescence with respect to the mock-transfected cells.

For analysis of DNA fragmentation, cells were trypsinized and resuspended in ice-cold PBS containing 75% ethanol. After one night at -20°C , cells were resuspended in PBS containing 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of propidium iodide (Sigma) and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of RNase A, and incubated at 37°C for 30 min. The samples were then analyzed after gating on the R0 region to eliminate the cell aggregates but not cell debris, as indicated on the figure.

Western Blotting—Cells were scraped in Laemmli lysis buffer. After quantification by the Coomassie Blue protein assay (Pierce), 75 μg of proteins were separated on a 8.5% polyacrylamide SDS-PAGE gel and transferred to a PVDF membrane (PerkinElmer Life Sciences). After blocking in PBS-T (PBS, 0.1% Tween 20) containing 5% (w/v) nonfat dry milk for 1 h at room temperature, the membrane was incubated with the primary antibody for 1 h at 37°C , rinsed in PBS-T, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature. After washing in PBS-T, immune complexes were detected using the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Signal kit (Pierce) and visualized by exposure to CL-XPosure film (Pierce). The membrane was then dehybridized and rehybridized to a mouse monoclonal anti-S6K antibody (Santa Cruz). The secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories.

RESULTS

Association of P-bodies with Mitochondria—We have previously studied the dynamics of P-bodies in live cells using a specific component, the DEAD box helicase Rck/p54, fused to RFP (19). In the course of this study, we noted that P-bodies were often located next to filamentous structures, which were reminiscent of mitochondria. For confirmation, RPE-1 epithelial cells were cotransfected with RFP-p54 and mtGFP, a GFP targeted to mitochondria (27), and observed live in phase-contrast and fluorescence microscopy after 36 h (Fig. 1A, left panel). The two regions enlarged in the right panels show the close proximity of P-bodies with mitochondria, which were filamentous in

phase-contrast and contained the mtGFP. This observation was further extended to non-transfected HeLa cells. Mitochondria were labeled *in vivo* by culture in the presence of fluorescent MitoTracker for 30 min at 37°C . After fixation, P-bodies were detected by immunostaining of Rck/p54. The association between P-bodies and mitochondria was visible in wide-field (Fig. 1B) and confocal microscopy (Fig. 1C). It was also observed in HEK 293 epithelial cells (data not shown), as well as in primary cultures of endothelial cells such as human umbilical vein endothelial cells (Fig. 1D). When P-bodies were classified as “associated” or not with mitochondria, as defined in the right panels of Fig. 1, B and C, we found 50 to 70% of the P-bodies associated with mitochondria, depending on the experiment and cell line.

To estimate the significance of this observation, we quantitatively analyzed experiments performed in HeLa cells. We measured in each cell the fraction of the P-bodies associated with mitochondria, and the fraction of the cytoplasm occupied by mitochondria. The results of such an analysis (25 cells, 373 P-bodies) are plotted in Fig. 1E. Despite important variations from cell to cell, the mean percentage of P-body associated with mitochondria (66%) was significantly higher than the mean area occupied by the mitochondria (58%, $p = 0.006$ in a paired *t* test). As a second assay, we analyzed the localization of these P-bodies after moving them 1 μm in the *x* and *y* axis (Fig. 1E). Their association with mitochondria decreased and became similar to the fraction of the cytoplasm occupied by the mitochondria (60%, $p = 0.40$). These two analyses establish that the frequent association between P-bodies and mitochondria does not simply result from a random localization of the P-bodies in the cytoplasm, but reflects a preferential association with mitochondria.

Direct Contacts between P-bodies and Mitochondria—To determine how close the association between P-bodies and mitochondria, and whether the association is direct or mediated by a third organelle, we analyzed HeLa cells by electron microscopy. Because P-bodies are most recognizable after immunogold detection of Rck/p54 (18), cells fixed in paraformaldehyde were embedded in Lowicryl K4M, and thin sections were incubated with an anti-p54 antibody coupled to gold particles (Fig. 2A). Under these conditions, immunostaining is optimal, but membranes are not stained, and mitochondria appear as large oval electron dense structures. Close contacts between P-bodies and mitochondria were readily observed at this high resolution. We also performed analysis in conventional electron microscopy. In the absence of labeling, low density of the P-bodies and their small number make it difficult to find them in thin sections. However, this can be circumvented by treatment of the cells with arsenite, which increases the size, density, and number of P-bodies (18). Arsenite-treated HeLa cells were fixed in glutaraldehyde, embedded in Epon, prior to observation of ultrathin sections. Tight contacts between P-bodies and mitochondria were also observed (Fig. 2B). The distance between the two organelles in Fig. 2B is less than 25 nm, which, for comparison, is the size of a ribosome. With both protocols, no close association was observed between P-bod-

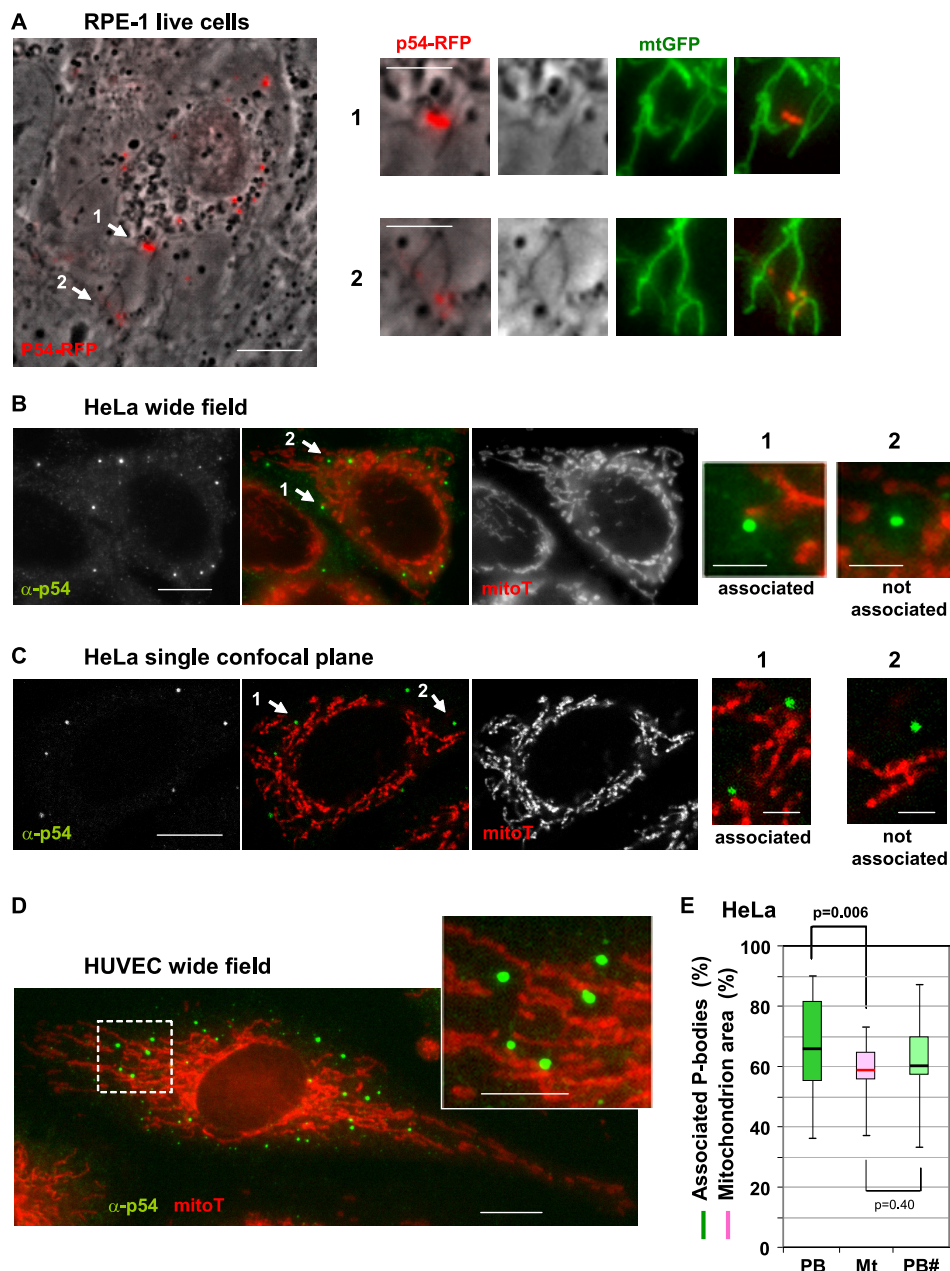


FIGURE 1. Association of P-bodies with mitochondria. A, RPE-1 cells cotransfected with p54-RFP and mtGFP were observed live with a wide-field microscope. The overlay of p54-RFP fluorescence and phase contrast is shown on the left panel. Bar = 10 μ m. Two regions of the cytoplasm indicated by arrows 1 and 2 were enlarged on the right panels. The phase contrast, mtGFP fluorescence, and p54-RFP/mtGFP overlay are juxtaposed. Bars = 5 μ m. B and C, HeLa cells were incubated with MitoTracker to stain mitochondria (red), then fixed and immunostained with anti-p54 antibodies (green). Cells were observed in wide-field (B) and confocal (C) microscopy. Bar = 10 μ m. Examples of P-bodies associated with mitochondria or not, were enlarged on the right panels. Bar = 2 μ m. D, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were stained and observed as in B. Bar = 10 μ m. The region indicated by the dashed box is enlarged on the right panel. Bar = 5 μ m. E, HeLa cells imaged as in B were individually analyzed for the percentage of P-bodies associated with mitochondria (PB) and the fraction of the cytoplasm occupied by the mitochondria (Mt). P-bodies were analyzed again after a 1- μ m shift on the x and y axis (PB#). The box-plot represents 25 cells containing 372 P-bodies (349 after shift), with the boxes containing 50% of the cells, and the middle bars marking the median values.

ies and other organelles, such as the ER, endosomes, or vacuoles.

Relative Movements of P-bodies and Mitochondria—We then investigated the dynamics of these contacts in live cells, using RPE-1 cells because their flat morphology facilitates time-lapse acquisition in microscopy. Cells were co-transfected with p54-RFP and mtGFP and individual cells were monitored for 3 min, with a stack of images captured in the two colors every 6 s. Images from two representative cells are presented in Fig. 3.

The first cell contains 11 P-bodies, 7 of them being associated with a mitochondrion at time 0 (Fig. 3A). Three of these P-bodies (PB1, PB2, and PB3) were enlarged on the right panel to illustrate their dynamics. PB1 separates from a mitochondrion at the beginning of the time-lapse, stays apart for 1 min, contacts it again, and separates after 1 min (supplemental Video S1). PB2 is never free, associating back and forth with two different mitochondria (supplemental Video S2). Its localization at the extremity of a mitochondrion is a frequently observed

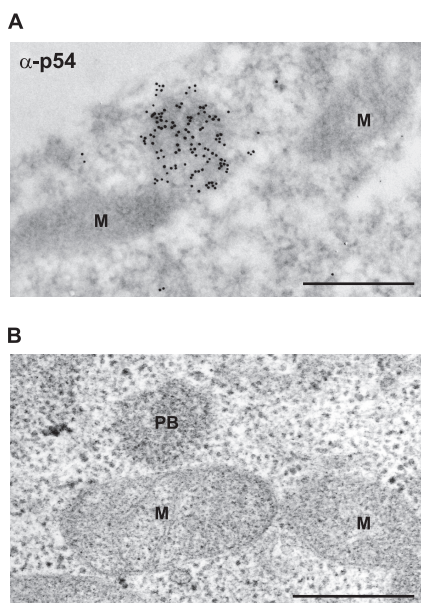


FIGURE 2. Contacts between P-bodies and mitochondria in electron microscopy. A, detection of Rck/p54 in Lowicryl-embedded HeLa cells. Cells fixed with paraformaldehyde were embedded in Lowicryl and immunostained with anti-p54 antibodies coupled to 10-nm gold particles. The labeling is concentrated over the P-body (PB) and shows its close association with the mitochondrion (M). Bar = 200 nm. B, thin section of a P-body in Epon-embedded HeLa cells. Cells treated with arsenite to enhance P-bodies were fixed with glutaraldehyde, embedded in Epon, and stained by lead citrate and uranyl acetate. A P-body (PB) tightly associated with a mitochondrion (M) is shown. Bar = 200 nm.

pattern. PB3 remains attached to one mitochondrion, and slides along it over 90 s ([supplemental Video S3](#)). This is rare behavior. The second cell contains 12 P-bodies, 10 on them being distant of mitochondria at time 0 (Fig. 3B). Three of these were enlarged. Although PB4 does not move much, during 35 s, a distant mitochondrion extends twice in its direction up to establishing contact, slides along it, and retracts again ([supplemental Video S4](#)). PB5 is immobile, whereas a neighboring mitochondrion associates transiently with it during 30 s ([supplemental Video S5](#)). Finally, PB6 is joined by a short mitochondrion that then remains attached to it ([supplemental Video S6](#)). Such short mitochondria were often observed associated with P-bodies at the periphery of the cytoplasm. Overall, even when P-bodies and mitochondria are far apart at one time, they frequently establish contacts within a few minutes. These contacts result more often from movements of mitochondria than of P-bodies.

Dynamics of the Association between P-bodies and Mitochondria—We then analyzed the dynamics of the association between P-bodies and mitochondria. First, individual P-bodies (106 P-bodies in 10 cells) were followed frame by frame in the previous experiment. Although only 44% of the P-bodies were associated with mitochondria at time 0, 81% of the P-bodies contacted a mitochondrion at least once during the 3-min movie. The duration of each contact (a total of 200 contact events for 106 P-bodies) was estimated taking into account that frames were 6 s apart (Fig. 4A). The association of P-bodies with mitochondria lasted from 6 s or less (1 frame) to 3 min or more (30 consecutive frames), with a median duration of 18 s (3 consecutive frames). The significance of contacts observed on a

single frame should not be underestimated, as they are frequent (30%). Instantaneous contacts occurring only during image acquisition (100 ms) would have a very low probability to be captured and can only represent a minor fraction of them. Overall, 54.5% of the contacts lasted more than 12 s, 26.5% more than 1 min, and 8.5% more than 3 min. In conclusion, the association with mitochondria concerns a large majority of the P-bodies and is long enough to enable molecular traffic between the two organelles.

As both mitochondria and P-bodies can be actively transported along microtubules (11, 31), we investigated if the microtubule network is required for the association between P-bodies and mitochondria. HeLa cells were treated with vinblastine for 1 h, which resulted in the full disruption of the microtubule network and the appearance of characteristic spiral aggregates of microtubules, as controlled by immunostaining of tubulin (Fig. 4B, lower panel). Mitochondria were then stained with fluorescent MitoTracker for 30 min in the presence of vinblastine, fixed, and immunostained with anti-p54 antibodies (Fig. 4B, upper panel). Vinblastine increased the number of P-bodies (from 13 to 20 P-bodies per cell in average), as previously reported (11). It also decreased the frequency of P-bodies associated with mitochondria from 57 to 46% (mean value of three experiments, $p = 0.045$, Fig. 4C). The significance of this decrease was evaluated by measuring in one experiment (31 vinblastine-treated cells, 661 P-bodies) the volume occupied by the mitochondria, the control cells being the one presented in Fig. 1E (see Fig. 4D). After vinblastine treatment, the mean percentage of P-bodies associated with mitochondria (58%) was similar to the mean area occupied by the mitochondria (60%), which indicated the loss of their preferential association with mitochondria. Therefore, the association between P-bodies and mitochondria in HeLa cells requires an intact microtubule network.

Association of P-bodies to Mitochondria Is Independent of Translation and Mitochondrial Activity—We then sought to investigate the role of P-bodies in mitochondrial functions. Some of the mitochondrial proteins are encoded by the nuclear genome, their mRNAs being translated at the surface of the mitochondria. As P-bodies could participate to the control of these mRNAs, we first investigated the effect of disrupting polysomes. HeLa cells were treated with puromycin or arsenite for 30 min, and fluorescent MitoTracker was then added to label mitochondria for 30 min in the presence of the drug. After fixation, P-bodies were immunostained with anti-p54 antibodies. The percentage of P-bodies associated with mitochondria was not significantly different from controls (Fig. 5A), indicating that the association of P-bodies with mitochondria is not dependent on active translation. As a more general assay, we also investigated if mitochondria were disturbed in the absence of P-bodies. HeLa cells were mock-transfected, or transfected with Rck/p54 and CPEB1 siRNAs, which suppress P-bodies, or with a control Globin siRNA, which does not (7). After 48 h, mitochondria were labeled with fluorescent MitoTracker to observe their morphology by microscopy ([supplemental Fig. S1A](#)). In parallel, the mitochondrial transmembrane potential was assessed in flow cytometry using the fluorescent cat-

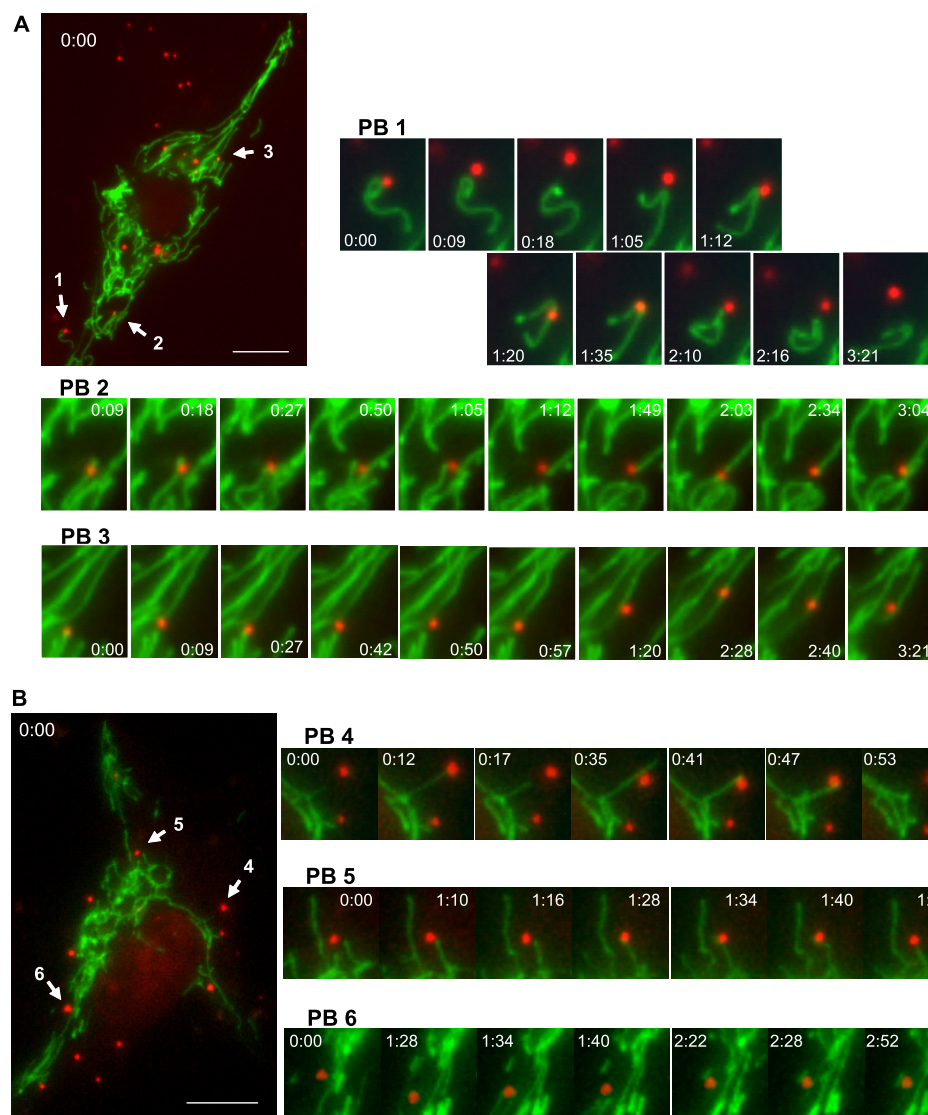


FIGURE 3. Relative movements of P-bodies and mitochondria in live cells. RPE-1 cells transfected with p54-RFP and mtGFP were observed in fluorescence microscopy during 3 min. The two cells chosen for illustration have half of their P-bodies (A) and no P-bodies (B) associated with mitochondria at time 0 (left panels). Bars = 10 μ m. The P-bodies indicated by arrows were enlarged on the right panels at the indicated time. PB1 illustrates the repeated contact of one P-body on one mitochondrion, PB2, a P-body skipping between two mitochondria, and PB3, a P-body sliding along a mitochondrion. The corresponding movies are supplemental Videos S1–S3. PB4 illustrates a mitochondrion extending to a distant P-body before retracting, PB5 is the repeated association of a P-body with a mitochondrion, and PB6 is a short mitochondrion joining a P-body. The corresponding movies are supplemental Videos S4–S6.

ionic dye 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (supplemental Fig. S1B). None of these assays showed differences related to the presence of P-bodies.

Conversely, we searched for a role of mitochondria in the assembly of P-bodies, using a mitochondrial poison. RPE-1 cells were transfected with mtGFP to detect mitochondria in live cells and observed in microscopy. The mitochondrial uncoupler CCCP was added during time-lapse acquisition and maintained for up to 19 h. CCCP had a drastic effect on the morphology of the mitochondria, which became swollen and shorter (Fig. 5B, left panel). It is of note that cell death was negligible even after a long CCCP treatment, as attested by the absence of a significant DNA fragmentation (supplemental Fig. S1C). The cellular ATP remained high for the first 8 h, probably due to the energetic metabolism switching from oxidative phosphorylation to glycolysis (Fig. 5C). However, P-bodies were not

affected, neither in terms of number nor size. This absence of effect was also observed in untransfected HEK 293 cells treated with CCCP for 8 and 16 h (Fig. 5D). Moreover, the frequency of P-body contacts with mitochondria was unchanged (Fig. 5B, right panel). Therefore, mitochondrial activity was not required for the maintenance of P-bodies. The next step was to assay the potential role of mitochondria in P-body activity.

Mitochondrial Activity and RNAi—To assess the impact of mitochondrial activity on RNAi we used a fluorescent reporter assay that enables measurement of silencing in individual cells by flow cytometry. Briefly, a bidirectional promoter under control of the tetracycline operator was used to drive the expression of DsRed and EGFP (Fig. 6A). Inserting si- or miRNA recognition sites in the EGFP 3' UTR rendered its expression responsive to silencing by the cognate small RNA, whereas that of DsRed was used to measure the activity of the promoter in

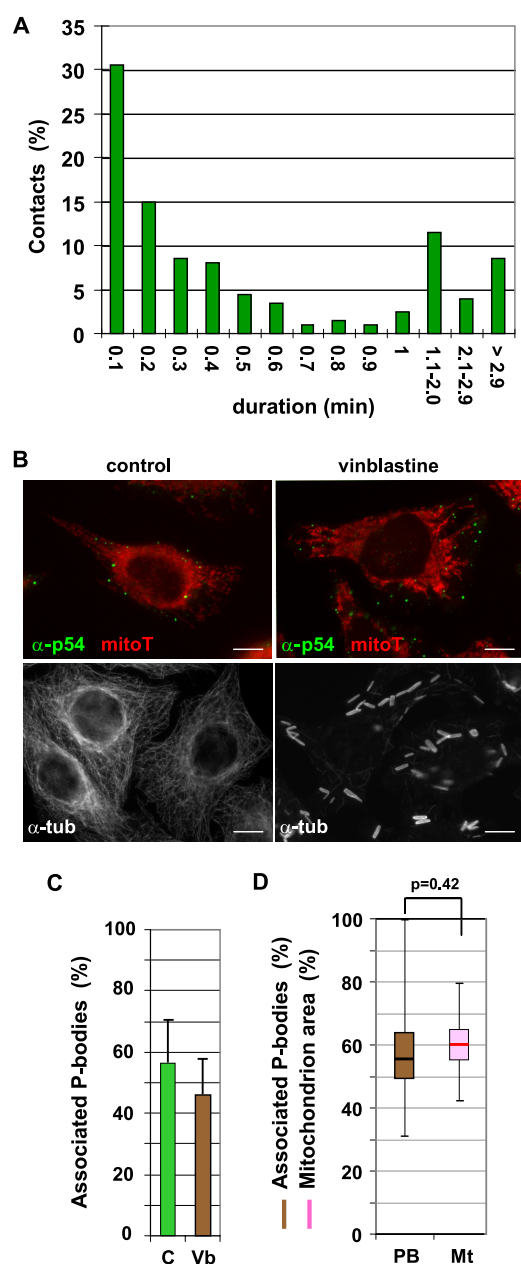


FIGURE 4. Dynamics of the contacts between P-bodies and mitochondria. **A**, duration of the contacts. The histogram represents the distribution of the contact durations in the experiment described in the legend to Fig. 3, as estimated from the number of successive frames showing a given contact. Long (1.1–2.0 min) and very long (2.1–2.9 min) contacts were pooled. **B**, disruption of the microtubules with drugs. HeLa cells were cultured in the presence of vinblastine for 1 h 30 min, labeled with MitoTracker (red) during the last 30 min and immunostained with anti-p54 antibodies (green) (upper panel), or immunostained with anti-tubulin antibodies (lower panel). Bars = 10 μ m. **C**, the percentage of P-bodies associated with mitochondria was measured in control (C) and vinblastine-treated cells (Vb) (mean \pm S.D. of three experiments, 18 to 30 cells, 225 to 611 P-bodies). **D**, vinblastine-treated cells were individually analyzed for the percentage of P-bodies associated with mitochondria (PB) and the fraction of the cytoplasm occupied by the mitochondria (Mt). The box-plot represents 31 cells containing 661 P-bodies.

the same cell. When the reporter construct was co-transfected with small RNA into HEK 293 Tet-on cells, a sensitive and robust measurement of silencing was achieved when expression of the construct was induced by doxycycline for at least 16 h. Noteworthy, the measured silencing then represents the

summation of the silencing that occurred since the addition of doxycycline.

We first assayed the silencing induced by let-7b on a perfectly matched target using the pBiFluo-silet7 construct as a reporter (Fig. 6B). Co-transfection of pBiFluo-silet7 with increasing doses of let-7b induced a decrease in EGFP expression with a plateau at 85% of silencing reached with 1 nM let-7b. When CCCP was added 3 h prior to transfection, the plateau was reached at the same let-7b concentration, but the silencing leveled off at 70%. Expression of the parental construct pBiFluo or pBiFluo-let7m with a mutated let7 binding site was unaffected by co-transfection of let-7b, whether or not in the presence of CCCP (supplemental Fig. S2A, and not shown). Thus, the efficacy of silencing by let-7b was reduced in the presence of CCCP.

The silencing by miRNA was studied using two well characterized model targets, the 3milet7 (29) and 2CXCR4 (28) motifs (Fig. 6A). Importantly, HEK 293 cells express a low level of endogenous let-7 miRNA but no detectable endogenous CXCR4 activity. In controls, the dose responses to their cognate RNA were similar for both targets, the silencing reaching a plateau at 50 to 60% (Fig. 6, C and D). For both constructs, the silencing was markedly reduced in the presence of CCCP and, again, this reduction could not be circumvented by increasing the dose of silencing RNA (Fig. 6, C and D). In these experiments, perfectly matched RNA duplexes were transfected to provide the miRNA activity. Importantly, the same effect of CCCP was observed when a pre-milet-7b RNA (the stem loop precursor of let-7b) was transfected to silence pBiFluo-silet7 or pBiFluo-3milet7 (supplemental Fig. S2B).

Although the impact of CCCP on silencing was visible from the mean EGFP fluorescence, the presence of DsRed within the reporter constructs allowed for a more detailed analysis. The bidirectional promoter drove expression of similar levels of EGFP and DsRed in individual cells, with expression levels spreading over 3 orders of magnitude (supplemental Fig. S2, C and E). CCCP reduced the expression of the reporter construct, but did not alter this correlation. We therefore gated the analysis on cells expressing a given level of DsRed (Region R1 in supplemental Fig. S2, C and E). In high expressers, where silencing is best measured, the efficiency of silencing by a miRNA mechanism was almost completely abrogated by CCCP (Fig. 6E). Indeed, whereas the average silencing was of the order of 50%, analysis at the level of individual cells revealed that miRNA could repress their target gene by more than 90%, in some of the cells (Fig. 6E).⁸ In the presence of CCCP, this maximal silencing was reduced more than 5-fold. The effect was not as dramatic when silencing was induced by a siRNA mechanism (supplemental Fig. S2D). In conclusion, CCCP reduced the silencing by siRNA and miRNA, and this effect was particularly drastic on miRNA silencing.

Mitochondrial Activity Is Required for RISC Assembly—To investigate whether the blockage of mitochondrial activity was acting at a specific step in silencing, we varied the timing of CCCP addition from 3 h before to 8 h after transfection of

⁸ L. Huang and F. Dautry, manuscript in preparation.

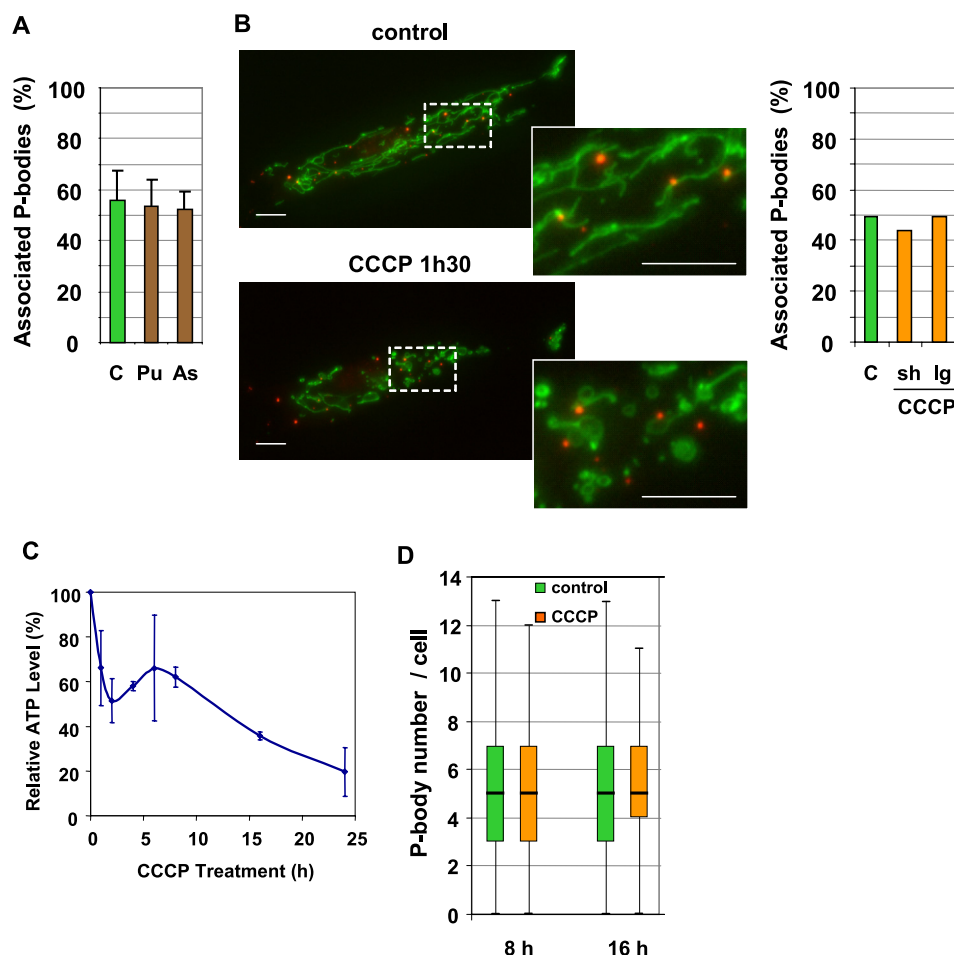


FIGURE 5. Contacts are independent of translation and mitochondrial activity. *A*, contacts are independent of translation. HeLa cells were cultured in the presence of puromycin (*Pu*) or arsenite (*As*) to inhibit translation, and stained with MitoTracker (*red*). Cells were then fixed and immunostained with anti-p54 antibodies (*green*). The histogram represents the percentage of P-bodies contacting mitochondria (mean \pm S.D. of three experiments, 14 to 29 cells, 75 to 930 P-bodies). *B*, P-bodies remain associated with mitochondria after CCCP treatment. RPE-1 cells were transfected with p54-RFP and mtGFP, and observed live in fluorescence microscopy. The same cell is shown before and after a 1 h 30 min treatment with CCCP. The *dashed boxes* indicate the regions of the cytoplasm enlarged on the *right panels*. Bars = 10 μ m. Contacts were counted in a panel of cells at different times after CCCP addition. The histogram represents the percentage of P-bodies associated with mitochondria before addition of CCCP (*C*), after short (6 to 105 min) (*sh*), or long (15 to 19 h) (*lg*) treatments with CCCP. *C*, ATP level of cells treated with CCCP. ATP levels were determined with a luciferase assay in cells treated or not with CCCP. The ratio of the values in treated to untreated cells is plotted as a function of time (mean \pm S.D. of three experiments). *D*, the number of P-bodies is independent of mitochondrial activity. HEK 293 cells were treated with CCCP for 8 and 16 h and immunostained with anti-p54 antibodies. The *box plot* represents the number of P-bodies per cell (three experiments, 105 to 143 cells).

let-7b. pBiFluo-3milet7 expression was induced at 8 h so that in all cases it took place after the addition of CCCP, and cells were analyzed 24 h later (Fig. 7A). Addition of CCCP before or at the time of transfection led to the same reduction of silencing as previously. By contrast, a progressive increase in silencing efficiency was observed when CCCP was added after the transfection, so that, by 8 h, it was almost the same as in the absence of CCCP. At this time, the silencing activity of the transfected RNA was almost maximum (data not shown), indicating that the small RNAs were fully incorporated into active RISC complexes. Therefore, the sensitivity of silencing to CCCP disappeared in relation to the formation of active RISC complexes. This was confirmed in dose-response studies where CCCP had no effect when added at 16 h post-transfection (supplemental Fig. S2F for 3milet7, data not shown for silet7). Thus, once they were formed, RISC complexes remained fully active despite the progressive decrease of ATP occurring during the 24-h CCCP treat-

ment (Fig. 5C). This also suggested that, when added early, CCCP was acting rapidly. To be able to study silencing after shorter CCCP treatments, we turned to a luciferase reporter to measure the silencing at 6 h post-transfection, at a time when ATP was only reduced by 40 to 50% (Fig. 5C). For the 3milet7 and silet7 targets (26) we observed the same reduction of the silencing efficiency of 2 nM let-7b as with the fluorescent reporters at later times ($p < 0.01$, supplemental Fig. S2G). Taken together these results establish that CCCP is acting rapidly on the assembly of active RISC complexes and has no impact on their activity once they are formed.

We then investigated whether localization of RISC components was affected by CCCP treatment. We studied the Ago2 protein, which is involved in both si- and miRNA-associated RISC (32), and for which specific monoclonal antibodies have been raised (30). HEK 293 cells were treated or not with CCCP for 16 h, and immunostained with anti-Ago2 antibody, along with anti-p54 as a P-body marker. In untreated HEK 293 cells, a

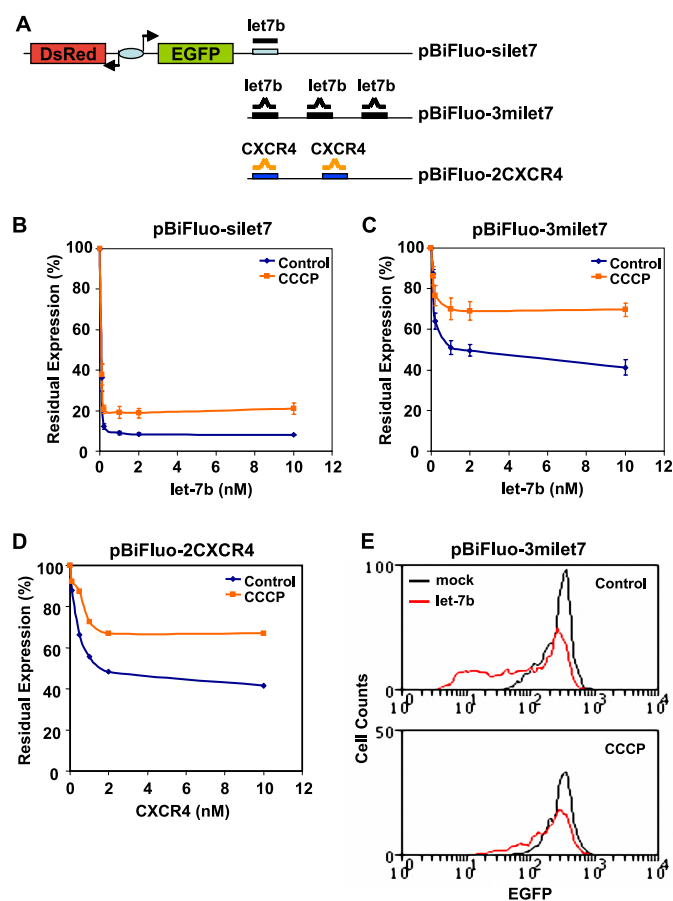


FIGURE 6. Inhibition of mitochondrial activity reduces siRNA and miRNA silencing efficiency. A, schematic representation of the reporter constructs. pBiFluo-silet7 and pBiFluo-3milet7 contain 1 perfect and 3 imperfect binding sites for let-7b in the 3' UTR of EGFP, respectively. pBiFluo-2CXCR4 contains 2 imperfect binding sites for CXCR4. B, silencing of pBiFluo-silet7 by let-7b. HEK 293 Tet-on cells were treated or not with CCCP for 3 h, and co-transfected with pBiFluo-silet7 and the indicated doses of let-7b. pBiFluo-silet7 expression was measured by cytometry 24 h later. The EGFP fluorescence in the presence and absence of CCCP was normalized with respect to DsRed fluorescence. The results are shown as the mean \pm S.D. of four experiments. C, silencing of pBiFluo-3milet7 by let-7b. Experiments and data analysis are as in B. D, silencing of pBiFluo-2CXCR4 by CXCR4. Experiments and data analysis are as in B, except for the use of CXCR4 instead of let-7b. Data from a single experiment are presented. E, silencing of EGFP in cells expressing high levels of pBiFluo-3milet7. Histograms present the EGFP expression of cells with high DsRed levels (region R1 in supplemental Fig. S2E), silenced or not with 2 nM let-7b, as indicated. The upper and lower panels show control and CCCP-treated cells, respectively.

fraction of Ago2 was enriched in the P-bodies, whereas the majority of the protein was localized diffusely in the cytoplasm (Fig. 7B, upper panel), as previously reported (14). CCCP treatment reduced the accumulation of Ago2 in the P-bodies, whereas Rck/p54 remained unchanged (Fig. 7B, lower panel). This effect was quantified by measuring Ago2 and Rck/p54 fluorescence in individual P-bodies (see "Experimental Procedures"). P-bodies were classified into 6 classes depending on their content in Ago2 or Rck/p54 (Fig. 7C). In untreated cells, Ago2 was enriched to various extents in 94% of the P-bodies (classes 1–5). After CCCP treatment, Ago2 enrichment was strongly reduced, with 70% of the P-bodies containing almost no Ago2 (class 0), whereas Rck/p54 distribution was similar to the control. The loss of Ago2 in P-bodies was specific, as it was observed neither for Rck/p54 nor Ge1 (Fig. 7D, left panel). It

was also observed after 8 h in CCCP, although to a lesser extent (Fig. 7D, right panel). Importantly, a Western blot analysis of Ago2 indicated that the protein was expressed at a similar level after up to a 24-h CCCP treatment (Fig. 7E). Altogether, these results indicate that CCCP inhibits RNAi, by acting at an early step of RISC assembly, and causes the delocalization of the Ago2 protein out of the P-bodies.

DISCUSSION

We have observed a preferential association of P-bodies with mitochondria in cell lines of various origins. The contacts between the two organelles are close, as judged by electron microscopy images. They are dynamic, a large majority of them lasting less than 3 min, with a median duration of contact of 18 s. They result more often from mitochondrial than from P-body movements in the cytoplasm. Interestingly, both mitochondria and P-bodies can traffic along the microtubule network (11, 31). Long-range movements ($>2 \mu\text{m}$) of P-bodies along microtubules are only occasional in RPE-1 cells and have a speed of about $1 \mu\text{m/s}$ (data not shown), as described in other cell lines (11). In contrast, movements of P-bodies leading to contacts with mitochondria are rather short ranged, disordered, and slow. For instance, PB1 and PB3 move at a maximal speed of 0.08 and 0.06 $\mu\text{m/s}$, respectively (Fig. 3A). Nevertheless, the complete disruption of the microtubule network with vinblastine suppressed the preferential association of P-bodies with mitochondria, indicating that microtubules are required for the encountering of the two organelles in the cytoplasm. Whether they are then required for maintaining the interaction itself remains to be determined.

Interestingly, there are arguments supporting a similar relationship between P-bodies and mitochondria in budding yeast. The Puf3 protein, which is a member of the Pumilio family, binds preferentially the 3' UTR of mRNAs of nuclear-encoded mitochondrial proteins (33). It contributes to their localization at the periphery of the mitochondria and to their deadenylation and degradation (34, 35). Puf3 has been reported to accumulate in mitochondria-associated foci (36) and P-bodies (37), strongly suggesting that P-bodies are also associated with mitochondria in yeast.

A number of mitochondrial proteins are encoded by mRNAs transcribed from the nuclear genome. Some of these mRNAs bind to the mitochondrial outer membrane for translation, so that P-bodies could associate with mitochondria to regulate them. Disturbing this regulation would be expected to affect the mitochondrial morphology and function, which are very sensitive to mitochondrial protein expression. We have been unsuccessful at showing that the absence of P-bodies is deleterious for mitochondria, suggesting that P-bodies do not play such a role. However, the argument is not definitive, as the absence of P-bodies similarly does not cause any major deregulation of mRNA degradation and storage in yeast, or the RNAi pathway (5–9). It was speculated that P-body function can still be fulfilled by P-body complexes when they are dispersed in microaggregates.

Alternatively, contacts between P-bodies and mitochondria could be required for functions fulfilled by the P-bodies. Mitochondria are involved in various cellular processes, including

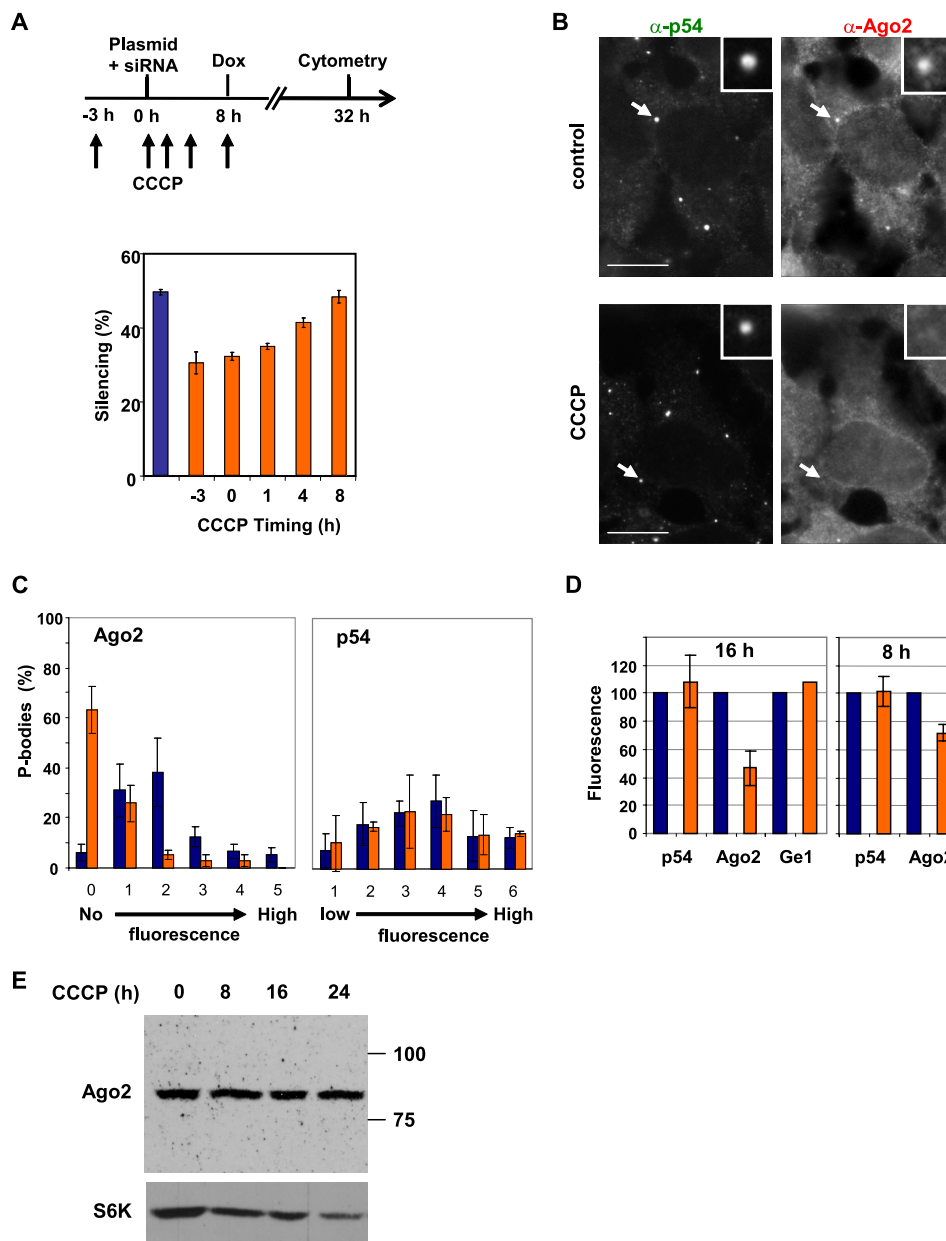


FIGURE 7. Inhibition of mitochondrial activity specifically decreases Ago2 in P-bodies. *A*, efficiency of pBifluo-3milet7 silencing by let-7b in function of the timing of CCCP addition. *Top*, schematic representation of the experimental design. *Bottom*, histograms of the silencing determined by measuring the mean EGFP expression in the presence and absence of 1 nM let-7b (mean \pm S.D. of three experiments). *B*, CCCP treatment reduces Ago2 localization in P-bodies. HEK 293 cells were treated or not with CCCP for 16 h and immunostained with anti-Ago2 (red) and anti-p54 (green) antibodies. Cells were observed in wide-field microscopy. Bars = 10 μ m. *C*, the enrichment of Ago2 and Rck/p54 in individual P-bodies was quantified in the previous experiment. The histogram represents the distribution of P-bodies in function of their enrichment in Ago2 or Rck/p54 before (blue) or after (orange) CCCP treatment (mean \pm S.D. of three experiments). *D*, Ago2 depletion in P-bodies is specific. Ago2, Rck/p54, and Ge1 were measured in P-bodies before (blue) or after (orange) the indicated times of CCCP. For Ago2 and Rck/p54, the results are shown as the mean \pm S.D. of three experiments (22 to 42 P-bodies). The fluorescence in control cells was arbitrarily set at 100. *E*, the Ago2 protein does not decrease during CCCP treatment. Cells were treated with CCCP for 0 to 24 h, and proteins were successively analyzed by Western blot with anti-Ago2 and S6K antibodies.

ATP production, Ca^{2+} homeostasis, reactive oxygen species signaling, and apoptosis (38). These functions are associated with specific intracellular localizations, or particular relationships with other organelles. For instance, mitochondria establish close contacts with the endoplasmic reticulum, which enable the generation of high local Ca^{2+} concentrations upon Ca^{2+} release from both organelles (39), as well as oscillations of this concentration by a mechanism involving Ca^{2+} shuttling between the two organelles (40). Mitochondria also accumulate at sites of high energy demand. Localization close to the plasma

membrane is thought to be important for ATP-driven ion pumps, whereas mitochondria surrounding the nucleus could provide the energy for nuclear import (38). A number of P-body components are dependent on ATP for their activity: helicases of the SF1 family, like Upf1, and of the DEAD-box family, like Ded1 (41) and Rck/p54. Notably, Rck/p54 is particularly abundant in P-bodies and is required for their assembly in mammalian cells (18, 42). One can speculate that continuous mRNP remodeling by this helicase within the P-body actively consumes ATP, which needs to be reloaded within minutes.

In addition to Rck/p54, P-bodies contain most components of the RNAi pathway, including the Ago proteins, miRNAs, miRNA-repressed mRNAs, and GW182. We designed a new reporter system to finely quantify silencing, based on the analysis of protein expression at the individual cell level. Notably, it allows the measurement of miRNA and siRNA activity when transfected at nanomolar concentrations. Inactivation of the mitochondrial function with CCCP markedly reduced the silencing by si- and miRNA. The same response was observed when small RNAs were provided as siRNA or pre-miRNA, suggesting that both Ago2 and the non-slicing Ago complexes (32) were similarly affected. The silencing, but not the dose response, was changed in the presence of CCCP, indicating that bioavailability of small RNA was not modified. Thus, either RISC loading or RISC activity was changed. Importantly, despite the progressive decline in cellular ATP, a prolonged exposure to CCCP did not change the efficiency of silencing once RISC complexes were formed (*i.e.* if CCCP was added at 8 h post-transfection). Therefore, mitochondrial activity is required for the assembly of active RISC complexes, but not for the silencing reaction itself. Accordingly, the effect of CCCP was not bypassed by increasing the amount of transfected small RNA. Taken together, these results establish that an early step in RISC assembly, common to both si- and miRNA silencing pathways, requires mitochondrial activity.

Strikingly, the inactivation of the mitochondrial function with CCCP strongly reduced the accumulation of endogenous Ago2, which is a central component of the RISC complex, in the P-bodies. However, it did not modify the number or size of the P-bodies, as judged by the presence of Rck/p54 and Ge1. The exact role of the P-bodies in RNAi is currently ambiguous, with arguments for either a central or an accessory role in RNAi, and loose links between RNAi and other P-body functions. If P-bodies were storage sites for miRNA-repressed mRNA, the reduction of Ago2 in the P-bodies could be the result of fewer RISC-associated mRNA entering the P-bodies. As a corollary, the Rck/p54 protein, which remains unchanged, would mostly participate to complexes other than RISC, and the P-bodies, which remain intact, would be mainly involved in functions other than RNAi. Alternatively, if the P-bodies were a source of RISC components, the fact that a defect in RISC assembly leads to blockage of Ago2 recruitment to P-bodies would suggest that RISC assembly can take place in P-bodies. In human cell lysates, RISC loading with small RNA duplexes (to form pre-Ago2-RISC) has recently been shown to be greatly facilitated by ATP, whereas the following unwinding of the small RNA (to form mature Ago2-RISC) and the silencing activity were ATP-independent (32). Thus, an intriguing possibility would be that the association of P-bodies with functional mitochondria might stimulate *in situ* assembly of pre-Ago2-RISC by increasing the local ATP concentration. Because in our study the decrease in intracellular ATP never exceeds 50% during the period of RISC assembly, this would indicate a high sensitivity of this process to ATP levels, which would normally be alleviated by frequent interactions between P-bodies and mitochondria. Alternatively, or in addition, mitochondria could contribute to RISC assembly by other

means than ATP supply. In this respect, it is highly interesting that miRNAs and Ago2 proteins were found in purified mitochondria (22, 23). As this accumulation was observed after RNase treatment, these miRNAs and Ago2 are likely to be located in the mitochondria rather than in mitochondria-associated P-bodies. If the mitochondria can play a role of miRNA reservoir, as proposed, the contacts between P-bodies and mitochondria could allow the transfer of miRNAs between the two organelles. To progress on these issues will require finding how to disrupt the contacts between P-bodies and mitochondria for a time sufficient to quantify the RNAi efficiency, making it possible to determine whether the mitochondria participate to RNAi through a mechanism dependent or not on their contacts with P-bodies.

Whatever the mechanism, the link between mitochondrial activity and RNAi revealed by the present study has potentially important corollaries. In human, mitochondrial dysfunctions are observed in various types of mitochondrial disorders, as well as in neurodegenerative diseases, diabetes, cancers, and upon aging. Mitochondrial activity can also be altered in various pathological conditions, such as cell stresses and ischemia reperfusion (38). Our results raise the possibility that these diseases and pathological conditions lead to some derepression of miRNA-controlled genes. Such a deregulation would be likely to significantly impact the cell metabolism in various tissues and contribute to the pathology.

Interestingly, mitochondria are also associated with P-body-related granules in germ cells of organisms such as *Xenopus*, *Drosophila*, and *Caenorhabditis elegans* (43, 44). Overall, germinal granules are thought to play a role in mRNA degradation and storage, like P-bodies, as well as in the repression of selfish genetic elements (45). Data obtained in *Drosophila* where they have been best characterized indicate that germinal granules contain a number of proteins identical or functionally related to P-body components. This includes proteins involved in mRNA storage, such as Me31B (Rck/p54/CGH1/Dhh1), 4ET, and Trailer hitch (RAP55/CAR1/Scd6), as well as proteins of the germline RNAi pathway, such as Aubergine, Tudor, and Maelstrom (46). Strikingly, among the 27 genes found in a genome-wide screen to identify genes involved in germinal silencing in *C. elegans*, 10 were directly involved in mitochondrial functions (47). These similarities strongly suggest that the association with mitochondria plays the same role for germinal granules and for P-bodies.

Acknowledgments—We thank Catherine Delmau for help in the culture of human umbilical vein endothelial cells, and Abbas Hadji and Damien Arnoult for the measurement of 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide incorporation. This work was performed in the FRE3238, at the Institut André Lwoff, Villejuif, France.

REFERENCES

1. Cole, S. E., LaRiviere, F. J., Merrikh, C. N., and Moore, M. J. (2009) *Mol. Cell* **34**, 440–450
2. Unterholzner, L., and Izaurralde, E. (2004) *Mol. Cell* **16**, 587–596
3. Cougot, N., Babajko, S., and Séraphin, B. (2004) *J. Cell Biol.* **165**, 31–40
4. Wilczynska, A., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., and Weil, D. (2005) *J. Cell Sci.* **118**, 981–992

5. Decker, C. J., Teixeira, D., and Parker, R. (2007) *J. Cell Biol.* **179**, 437–449
6. Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., and Izaurralde, E. (2007) *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3970–3981
7. Serman, A., Le Roy, F., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., and Weil, D. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**, 4715–4727
8. Stalder, L., and Mühlemann, O. (2009) *RNA* **15**, 1265–1273
9. Sweet, T. J., Boyer, B., Hu, W., Baker, K. E., and Collier, J. (2007) *RNA* **13**, 493–502
10. Yang, Z., Jakymiw, A., Wood, M. R., Eystathioy, T., Rubin, R. L., Fritzler, M. J., and Chan, E. K. (2004) *J. Cell Sci.* **117**, 5567–5578
11. Aizer, A., Brody, Y., Ler, L. W., Sonenberg, N., Singer, R. H., and Shav-Tal, Y. (2008) *Mol. Biol. Cell* **19**, 4154–4166
12. Andrei, M. A., Ingelfinger, D., Heintzmann, R., Achsel, T., Rivera-Pomar, R., and Lührmann, R. (2005) *RNA* **11**, 717–727
13. Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Golan, D. E., and Anderson, P. (2005) *J. Cell Biol.* **169**, 871–884
14. Leung, A. K., Calabrese, J. M., and Sharp, P. A. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 18125–18130
15. Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., and Filipowicz, W. (2006) *Cell* **125**, 1111–1124
16. Brengues, M., Teixeira, D., and Parker, R. (2005) *Science* **310**, 486–489
17. Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I. J., Stahl, J., and Anderson, P. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 195–210
18. Souquere, S., Mollet, S., Kress, M., Dautry, F., Pierron, G., and Weil, D. (2009) *J. Cell Sci.* **122**, 3619–3626
19. Mollet, S., Cougot, N., Wilczynska, A., Dautry, F., Kress, M., Bertrand, E., and Weil, D. (2008) *Mol. Biol. Cell* **19**, 4469–4479
20. Gibbins, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009) *Nat. Cell Biol.* **11**, 1143–1149
21. Lee, Y. S., Pressman, S., Andress, A. P., Kim, K., White, J. L., Cassidy, J. J., Li, X., Lubell, K., Lim do, H., Cho, I. S., Nakahara, K., Preall, J. B., Bellare, P., Sontheimer, E. J., and Carthew, R. W. (2009) *Nat. Cell Biol.* **11**, 1150–1156
22. Bian, Z., Li, L. M., Tang, R., Hou, D. X., Chen, X., Zhang, C. Y., and Zen, K. (2010) *Cell Res.* **20**, 1076–1078
23. Kren, B. T., Wong, P. Y., Sarver, A., Zhang, X., Zeng, Y., and Steer, C. J. (2009) *RNA Biol.* **6**, 65–72
24. MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V., and Doudna, J. A. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 512–517
25. Ohrt, T., Mütze, J., Staroske, W., Weinmann, L., Höck, J., Crell, K., Meister, G., and Schwill, P. (2008) *Nucleic Acids Res.* **36**, 6439–6449
26. Zhang, D. H., Marconi, A., Xu, L. M., Yang, C. X., Sun, G. W., Feng, X. L., Ling, C. Q., Qin, W. Z., Uzan, G., and d'Alessio, P. (2006) *J. Leukocyte Biol.* **80**, 309–319
27. Rizzuto, R., Brini, M., Pizzo, P., Murgia, M., and Pozzan, T. (1995) *Curr. Biol.* **5**, 635–642
28. Doench, J. G., Petersen, C. P., and Sharp, P. A. (2003) *Genes Dev.* **17**, 438–442
29. Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005) *Science* **309**, 1573–1576
30. Rüdell, S., Flatley, A., Weinmann, L., Kremmer, E., and Meister, G. (2008) *RNA* **14**, 1244–1253
31. Boldogh, I. R., and Pon, L. A. (2007) *Trends Cell Biol.* **17**, 502–510
32. Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., and Tomari, Y. (2010) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 17–23
33. Gerber, A. P., Herschlag, D., and Brown, P. O. (2004) *PLoS Biol.* **2**, E79
34. Foat, B. C., Houshmandi, S. S., Olivas, W. M., and Bussemaker, H. J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 17675–17680
35. Saint-Georges, Y., Garcia, M., Delaveau, T., Jourdain, L., Le Crom, S., Lemoine, S., Tanty, V., Devaux, F., and Jacq, C. (2008) *PloS One* **3**, e2293
36. García-Rodríguez, L. J., Gay, A. C., and Pon, L. A. (2007) *J. Cell Biol.* **176**, 197–207
37. Lee, S. I., Dudley, A. M., Drubin, D., Silver, P. A., Krogan, N. J., Pe'er, D., and Koller, D. (2009) *PLoS Genet.* **5**, e1000358
38. Kuznetsov, A. V., and Margreiter, R. (2009) *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 1911–1929
39. Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A., and Pozzan, T. (1998) *Science* **280**, 1763–1766
40. Ishii, K., Hirose, K., and Iino, M. (2006) *EMBO Rep.* **7**, 390–396
41. Beckham, C., Hilliker, A., Cziko, A. M., Noueiry, A., Ramaswami, M., and Parker, R. (2008) *Mol. Biol. Cell* **19**, 984–993
42. Minshall, N., Kress, M., Weil, D., and Standart, N. (2009) *Mol. Biol. Cell* **20**, 2464–2472
43. Chuma, S., Hosokawa, M., Tanaka, T., and Nakatsuji, N. (2009) *Mol. Cell. Endocrinol.* **306**, 17–23
44. Moser, J. J., and Fritzler, M. J. (2010) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 828–843
45. Lim, A. K., and Kai, T. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 6714–6719
46. Thomson, T., Liu, N., Arkov, A., Lehmann, R., and Lasko, P. (2008) *Mech. Dev.* **125**, 865–873
47. Vastenhout, N. L., Fischer, S. E., Robert, V. J., Thijssen, K. L., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J., and Plasterk, R. H. (2003) *Curr. Biol.* **13**, 1311–1316

Chapitre IV. Contribution des protéines Ago à la régulation en mode miARN

Les protéines Ago sont au cœur de la régulation par les petits ARN. Chez les mammifères, quatre protéines Ago (de la sous-famille Ago) sont exprimées, Ago2 est le seul membre de ce groupe qui a une activité endonucléolytique et est donc l'unique protéine impliquée dans le silencing en mode siARN. Les autres membres de la famille ne peuvent pas participer directement à ce mode de silencing (il pourraient cependant agir en tant que compétiteur inactifs pour les petits ARN). En ce qui concerne l'implication des différents membres de cette famille dans le silencing en mode miARN, il existe assez peu de données mais les études effectuées sont en faveur d'un rôle majeur d'Ago2. Cependant il existe des données qui établissent que les autres protéines peuvent participer à la régulation en mode miARN. Dans ce dernier chapitre sont présentés les résultats obtenus avec notre système expérimental sur la participation des protéines Ago au silencing en mode miARN.

I. Approches expérimentales

La stratégie pour les études de l'implication de chaque protéine Ago au sein d'un silencing en mode miARN est l'utilisation de notre système rapporteur fluorescent dans différents contextes d'expression des protéines Ago. Notre équipe possède des petit ARN qui cible la région codante de l'ARNm de différentes protéines Ago (ces siARN sont désignés ci-après siAgo). Ces siAgo sont capables d'inhiber l'expression de ces protéines en dégradant leurs ARNm (Fig. 42). La comparaison du niveau de silencing en mode miARN entre la situation contrôle où aucune protéine Ago n'est inhibée et le cas où une protéine Ago est réprimée par un siAgo peut fournir des informations sur l'importance de chacune des protéines Ago dans cet événement.

RESULTATS

Contribution des protéines Ago

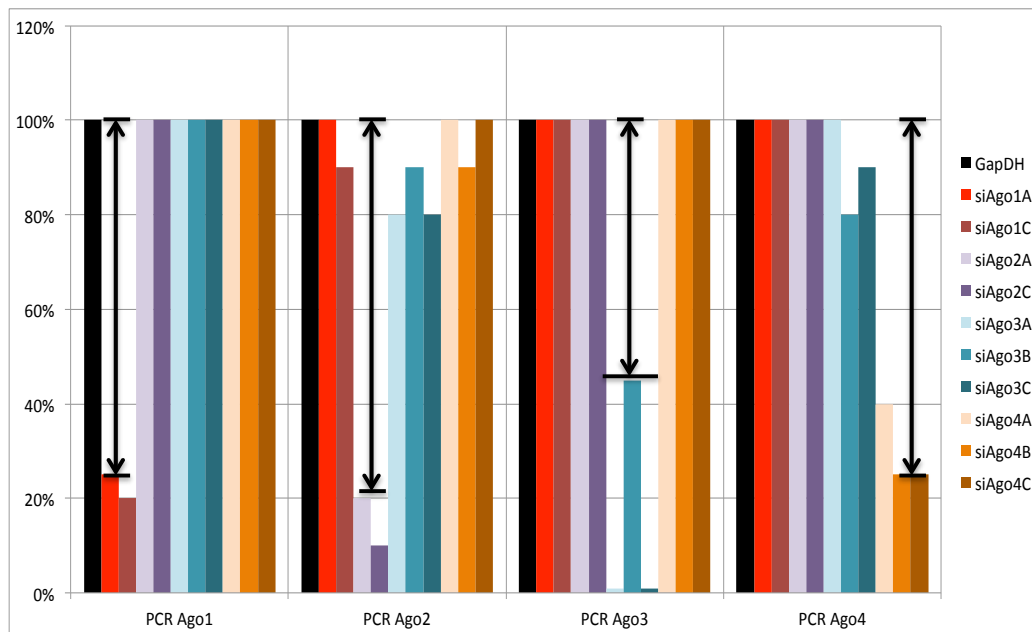


Figure 42, Validation de l'efficacité des siAgo par qRT-PCR. L'efficacité du silencing des différents messagers Ago a été mesurée par RT-PCR sur les ARNm de cellules transfectées avec 5 nM de siAgo. La transcription inverse a été faite avec l'amorce d(T)₁₈ tandis que les analyses par PCR ont été faites avec des amorces spécifiques décrites dans les Matériels et Méthodes. Les différents siAgo utilisés diminuent l'abondance de leur ARNm cible d'environ deux cycles (soit un silencing de l'ordre de 75%). L'histogramme en noir représente le signal du contrôle. Les flèches indiquent les changements d'expression observés en présence de siAgo correspondant au messenger Ago analysé. Il a de plus été vérifié que les siAgo utilisés dans les analyses suivantes n'ont pas d'effet sur l'expression de l'EGFP et de la DsRed dans les cellules HEK293 Tet-On. Expérience effectuée par Feifei Liang.

L'utilisation de siAgo pour inhiber l'expression des protéines Ago est une approche simple et facile à mettre en œuvre. Cependant, ce type d'approche ne peut aboutir qu'à une diminution partielle de la quantité de protéines Ago dans une cellule et non à une extinction complète. Cette limite est vraie en général dès lors que l'on utilise l'interférence par l'ARN, mais dans le cas des protéines Argonaute, on se heurte de plus à la difficulté que l'interférence dépend de ces protéines pour sa mise en œuvre, en tout cas au moins pour Ago2. Ainsi, l'efficacité d'inhibition d'Ago2 pourrait être particulièrement limitée puisque celle-ci est indispensable pour sa propre inhibition. Une deuxième difficulté est que l'on veut tester l'activité de deux petits ARN simultanément (un pour cibler Ago, un pour mesurer l'efficacité du silencing), il est donc possible qu'il existe une compétition entre ces deux petits ARN exogènes pour la formation des complexes RISC. Pour ces raisons, il est indispensable d'optimiser les conditions expérimentales pour détecter l'effet d'une diminution des protéines Ago sur le silencing en mode miARN. Un premier objectif est de trouver une dose appropriée de petit ARN régulateur lors du deuxième test, qui

RESULTATS

Contribution des protéines Ago

induit un silencing partiel de manière à être sensible à une diminution du nombre de complexe RISC. Des expériences préliminaires m'ont amené à choisir une dose de 1 nM de petit ARN régulateur pour le test d'efficacité du silencing associée à 2 nM de siAgo.

Un autre aspect de ces expériences est lié à la forme sous laquelle les petits ARN sont introduits. Plusieurs études suggèrent que lorsque l'on utilise des petits ARN double-brin parfaitement complémentaires, ils conduisent préférentiellement à des complexes RISC actifs lorsqu'ils sont associés à Ago2. Ceci reflète la nécessité d'éliminer le brin passager et comme il est envisagé que dans le cas d'un double brin parfait, cette élimination du brin se fait principalement par coupure endonucléolytique, qui pourrait être l'apanage d'Ago2. Dans ce cas, le rôle joué par les autres protéines Ago sera masqué : l'inhibition des autres protéines Ago n'aura pas d'effet sur le silencing établi par silet-7b non pas parce qu'elles ne jouent pas de rôle, mais parce qu'elles sont exclues du système de silencing à cause de ce biais de chargement. Toutefois, l'observation que des complexes RISC actifs contenant Ago1 peuvent être formés montre que la situation est probablement plus complexe. Néanmoins, pour prendre en compte cet aspect, on peut utiliser, au lieu d'une forme « siARN », un précurseur qui reproduit la structure du pré-miARN. Dans cette étude j'ai donc utilisé en parallèle le précurseur pré-miARN-7b et une forme « siARN » dans laquelle la séquence du brin guide de let-7b est hybridée à un brin parfaitement complémentaire.

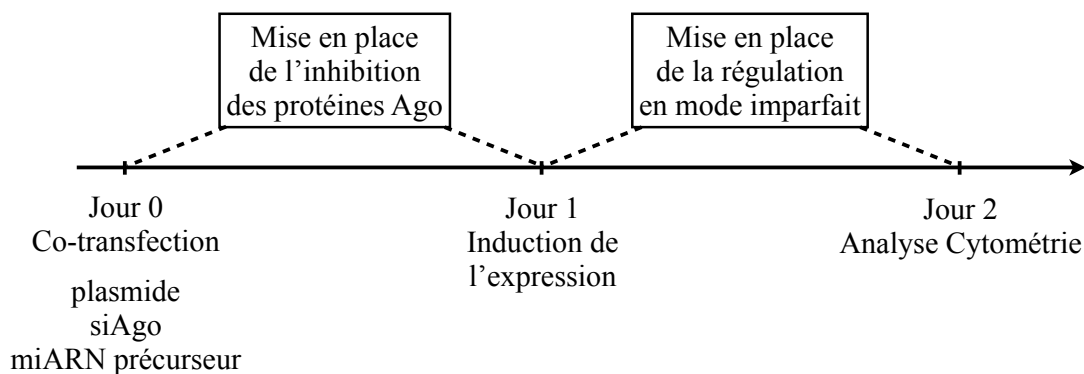


Figure 43, Représentation schématique des analyses du silencing en mode miARN avec l'inhibition des protéines Ago.

Les grandes lignes des expériences inhibant l'expression des protéines Ago sont illustrées dans la Figure 43. Il s'agit d'expériences de transfection transitoire, le plasmide rapporteur, le petit ARN régulateur et le siAgo sont co-transfectés dans les cellules HEK293 Tet-On par des précipités de phosphate de calcium. L'induction tardive (16 H après la transfection) du plasmide rapporteur permet non seulement la pré-installation du système de silencing en

mode miARN avant que ses ARNm cibles soient exprimés à une quantité importante, elle établit également l'inhibition des protéines Ago avant que ce même silencing soit en fonctionne. Cette organisation optimisera l'observation des effets de la diminution des protéines Ago sur la régulation en mode miARN que nous voulons étudier.

II. Ago2 est important pour la régulation induite par les précurseurs de miARN

En prenant la stratégie décrite ci-dessus, nous avons mis en évidence que parmi les quatre protéines Ago, Ago2 est le seul membre activement impliqué dans la régulation en mode miARN. Les données montrées dans la Figure 44 ont été obtenues en utilisant pBiFluo-3milet7 comme plasmide rapporteur et pré-milet-7b en tant que petit ARN régulateur. Le niveau du silencing dans différents contextes de l'expression des protéines Ago est exprimé par « *Expression relative d'EGFP* », cette valeur est calculée par la comparaison entre la situation contrôle où le silencing en mode miARN émis sur l'expression d'EGFP par pBiFluo-3milet7 n'est pas en place (co-transfection avec un si ARN qui ne cible pas la construction indicatrice) et la situation où son expression est inhibée par précurseur pré-milet-7b. Les valeurs d'EGFP sont normalisées par la valeur moyenne de DsRed de la population cellulaire correspondante. Les détails de la définition de l'« *Expression relative d'EGFP* » ont été discutés auparavant (formule à P67).

Quand un siARN est utilisé pour diminuer le niveau d'expression d'un gène endogène, comme dans le cas où nous utilisons les siAgo pour inhiber l'expression des protéines Ago, il y a un risque que le siARN ciblent d'autres gènes que le gène cible désiré à travers un effet « hors cible ». Pour être sûr que l'effet que l'on observe est vraiment dû à la diminution de la protéine Ago, nous avons vérifié l'effet observé en utilisant au moins deux siAgo dont la séquence du brin guide est différente (qui ciblent alors différente partie de la région codante d'Ago) .

RESULTATS

Contribution des protéines Ago

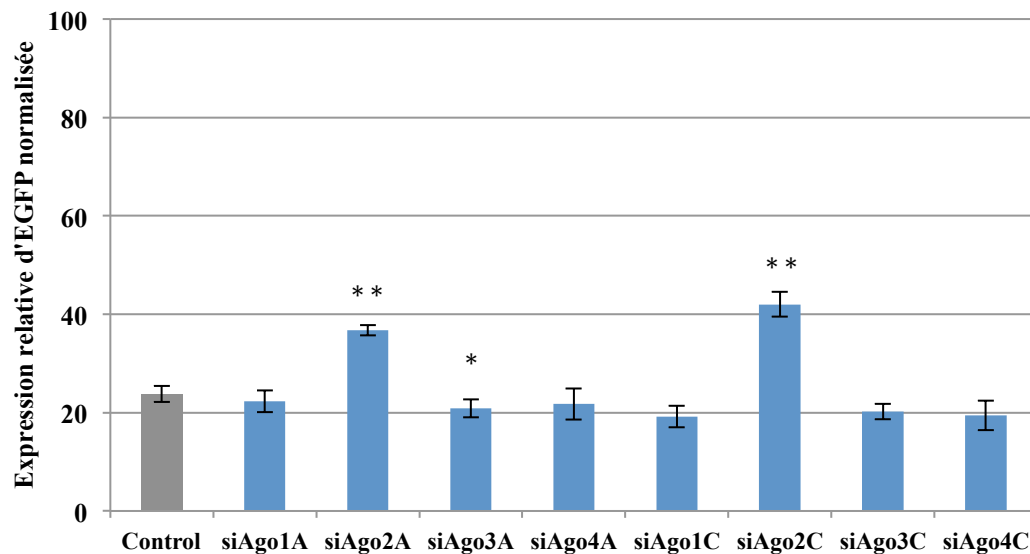


Figure 44, Ago2 joue un rôle important dans le silencing en mode miARN. Les cellules HEK293 Tet-On sont transfectées par le plasmide rapporteur pBiFluo-3milet7 avec 1 nM de précurseur de miARN pré-milet-7b et 2 nM de siAgo ciblant un membre de la famille Ago. Pour la situation sans régulation en mode miARN, 1 nM de siCD9 est introduit à la place de pré-milet-7b. Pour la situation contrôle sans inhibition des protéines Ago (colonne « Control » en gris), 2 nM d'un cocktail siARN (qui ne cible ni les protéine Ago ni les gènes rapporteurs) est introduit en complément avec 1 nM pré-milet-7b. L'expression des gènes rapporteurs est induite 32 h avant l'analyse par la cytométrie. Les colonnes montrent le niveau relatif d'EGFP (par rapport à la situation où l'expression d'EGFP n'est pas régulée) dans différents contexte d'inhibition des protéines Ago : la grise correspond au cas où aucune protéine Ago est inhibée, les bleues pour les cas où l'une des protéines Ago est inhibée par le siAgo indiqué. La différence entre le niveau du silencing en mode miARN de chaque Ago-inhibition et celui de contrôle (colonne « Control ») est testée par un *t-test* ($n = 3$, $p < 0,01$: ** ; $p < 0,05$: *). L'effet des siAgo utilisés est validé dans la **Figure 42**.

Parmi les 8 siAgo testés, seuls les 2 siAgo inhibant l'expression d'Ago2 suppriment partiellement le silencing de l'EGFP (Fig. 44). Le taux de l'augmentation d'expression d'EGFP est limitée mais significatif ($p < 0,01$). L'inhibition des autres membres de la famille Ago n'a pas d'effet marqué sur le silencing. Nous notons que, au lieu de diminuer le silencing, l'inhibition des autres protéines Ago le renforce. Ce renforcement est reflété par une baisse de l'expression d'EGFP quand ces protéines Ago sont régulées. La baisse d'EGFP dans ces cas est cependant faible sauf dans le cas où la protéine Ago3 est inhibée par siAgo3A où cette baisse représente une différence significative par rapport au contrôle ($p < 0,05$). Ensemble, ces observations mettent en évidence l'importance de la protéine Ago2 pendant le silencing en mode miARN. Par cette approche on n'observe pas

RESULTATS

Contribution des protéines Ago

d'implication des autres protéines Ago dans ce type de silencing si ce n'est comme des compétiteurs.

Bilan

D'après ces données, la protéine Ago2 est le seul acteur essentiel impliqué dans le silencing en mode miARN, comme dans le cas du silencing en mode siARN. Les 3 autres membres de la famille ne semblent pas jouer un rôle dans ces 2 types de régulation post-transcriptionnelle.

Une question intéressante concernant cette sous-famille de protéines est la raison de la conservation des quatre membres de la famille quand un seul participe activement au silencing en mode siARN et miARN. Nos résultats préliminaires suggèrent qu'en baissant l'expression des protéines Ago autre qu'Ago2 par différents siAgo, le niveau du silencing en mode miARN augmente légèrement, ce renforcement du silencing, même marginal, est souvent observé. Le fait que cette augmentation n'est pas statistiquement significative par rapport au contrôle est probablement la conséquence de la limitation de système expérimental. L'inhibition des protéines Ago par une autre approche pourrait rendre ses effets plus visibles. Si la répression de l'expression des protéines non-Ago2 améliore vraiment le silencing en mode miARN, nous pourrions imaginer que les protéines Ago1, 3 et 4 n'ont pas de fonction durant cette régulation, elles seraient en fait des compétiteurs d'Ago2 qui piègent une partie des petits ARN, quelque soient leur origine, ayant la potentialité de réguler l'expression des gènes. Cet effet de « tampon » pourrait contribuer au maintien de la stabilité des systèmes biologiques en stabilisant le niveau des facteurs qui y sont impliqués.

PARTIE III. DISCUSSIONS

I. Régulation par les miARN : efficacité et mécanisme

Toutes les données disponibles dans la littérature concernant les régulations post-transcriptionnelles induites par les siARN et les miARN indiquent qu'en dépit de leurs nombreux points communs, et chez les mammifères de l'absence de séparation claire entre ces deux voies, elles diffèrent néanmoins par leurs activités biologiques. En mode siARN, la régulation par les petits ARN est organisée autour de la protéine Ago2 (Guo et al. 2010; J. Liu et al. 2004; Meister et al. 2004; Mescalchin et al. 2010), dont l'activité endonucléolytique lui permet de couper l'ARNm cible et ainsi d'induire sa dégradation (Haley & Zamore 2004; Houseley et al. 2006; Hutvagner & Zamore 2002; R. Parker & H. Song 2004). Les caractéristiques enzymatiques de cette coupure d'ARNm, avec l'absence de coupure du brin guide, suggèrent que cette régulation est un processus catalytique. De fait, les complexes RISC formés autour d'Ago2 peuvent être recyclés et traiter plusieurs molécules d'ARNm cible (Z. Yang et al. 2004; Haley & Zamore 2004; Hutvagner & Zamore 2002). Par analogie avec les autres nucléases connues il semble donc a priori évident que le silencing en mode siARN doit être robuste et efficace. Dans la réalité, même si le choix du petit ARN est en fait une étape limitante, l'interférence par l'ARN est maintenant un outil très répandu pour inhiber l'expression des gènes endogènes avec, dans la majorité des cas, un niveau satisfaisant de répression de l'expression. Si, dans la plupart des cas, il est difficile d'obtenir un silencing supérieur à 80%, de nombreuses étapes de l'expérience peuvent en être responsables (efficacité de transfection, existence d'un pool de protéine avec une demi-vie longue, stabilité limitée du petit ARN, etc.) sans que l'on ait à mettre en cause l'efficacité du silencing. D'ailleurs, lors de la mise en évidence de l'interférence par l'ARN chez *C. elegans*, la similarité des phénotypes obtenus avec ceux des mutants nuls a conforté l'idée d'un silencing très efficace. On peut cependant noter que dans la transposition de l'interférence aux cellules de mammifère par le groupe de T. Tuschl, la même mesure effectuée dans des cellules de Drosophile et des cellules de mammifère montrait une efficacité beaucoup plus faible dans ces dernières suggérant que le mécanisme n'était pas aussi performant (Elbashir, Harborth, et al. 2001a; Elbashir, Martinez, et al. 2001b).

Par opposition, depuis sa découverte, la régulation en mode imparfait (« mode miARN ») a toujours été considérée comme une régulation « douce ». Cette perception vient principalement des observations suivantes: i) si *lin-4* et *let-7*, les deux exemples historiques ont été identifiés dans des cribles génétiques, ce sont pratiquement les seuls cas où un miARN est associé à un phénotype fort *in vivo*, ainsi, alors qu'un siARN peut mimer une mutation nulle, les miARN sont difficilement détectables par la génétique « classique » (Alvarez-Saavedra & Horvitz 2010; Miska et al. 2007); ii) la présence de mésappariements dans la région du site de coupure empêche l'activité endonucléolytique et exclut le mode catalytique décrit pour l'interférence par l'ARN; iii) l'observation dans certaines expériences d'une régulation de la traduction (Chekulaeva et al. 2011; Carthew & Sontheimer 2009; Fabian et al. 2011; Eulalio, Huntzinger & Izaurralde 2008a; Fabian et al. 2009; Filipowicz et al. 2008; Su et al. 2011) suggère un mode d'action stœchiométrique où la régulation n'est effective que tant que le complexe miRISC est présent sur l'ARNm cible. Une conséquence d'un tel mode d'action est que la régulation est potentiellement réversible si, par exemple, l'affinité du complexe RISC pour sa cible peut être modulée. C'est précisément ce qui a été décrit pour les ARN messagers du gène CAT-1 et leur régulation par miR-122; mais la généralité de ce type de régulation reste à établir (Bhattacharyya et al. 2006).

Nos observations sur le silencing en mode miARN donnent un autre éclairage sur cette régulation et ses différences avec le mode siARN. De fait, nos données établissent plus de similarités entre les deux modes que de différences. Tout d'abord, dans les cellules où le silencing en mode miARN est actif, son niveau maximal est comparable à celui du silencing en mode siARN (**Fig. 19 et 20**), ainsi il n'existerait pas de différence intrinsèque dans l'efficacité du silencing. Deuxièmement, les doses efficaces 50 pour les deux modes de silencing sont aussi comparables, indiquant que les besoins en petits ARN sont du même ordre (**Fig. 22**). De plus, comme dans ces expériences on change la nature de la cible, c'est la capacité d'un même petit ARN à fonctionner dans les deux modes qui est mesurée, assurant que les questions de biodisponibilité ne faussent pas le résultat. Troisièmement, bien que dans nos expériences l'expression du gène cible puisse varier de manière considérable – sur plus de quatre ordres de grandeur – aucune saturation de la régulation en mode miARN n'est observée même aux niveaux d'expression les plus forts (**Fig. 24**). Cette observation peut d'ailleurs être faite avec des doses faibles de petit ARN qui ne confèrent qu'un silencing partiel. Ce dernier point est en contradiction directe avec

un mécanisme stœchiométrique et ne peut être interprété que dans le cadre d'un mécanisme catalytique.

Avant de proposer un tel mécanisme, il est important d'examiner les limitations de nos données. Dans un premier temps j'ai effectué des co-transfections de la construction indicatrice et du petit ARN, ce qui permet d'obtenir des données très reproductibles mais introduit clairement un biais expérimental. Même si une partie des différences du niveau d'expression entre cellules est attribuable à l'activité du transactivateur, il est très probable que les cellules qui expriment le plus sont celles qui ont reçu la plus grande quantité de plasmide (et de petit ARN). D'ailleurs, lors des études sur la transfection du petit ARN on peut observer que toutes les cellules « fortes expresseuses » ont tous reçus des quantités importantes de petit ARN (**Fig. 28**). Pour contourner ce biais, j'ai donc procédé à des expériences de double-transfection dans lesquelles le plasmide est d'abord introduit par une transfection de phosphate de calcium puis le petit ARN par celle de lipofectamine. En dépit d'une dispersion des données un peu plus importante que dans le cas de la co-transfection, la même conclusion peut être tirée des données : l'absence de saturation aux forts niveaux d'expression du gène cible. Toutefois, même si les deux techniques de transfection utilisées reposent sur des principes physicochimiques différents, nous ne pouvons pas exclure qu'il puisse subsister des biais et que les cellules « fortes expresseuses » appartiennent à une sous-population spécifique de cellules « hautement transfectables », même si, dans ces double-transfections il n'existe plus de lien mécanique direct entre le petit ARN et le plasmide. Aussi une interprétation plus limitée de ces résultats est-elle que ces expériences ne mettent pas en évidence une saturation du silencing en dépit d'une large gamme d'expression. J'ai essayé de compléter ces données par une autre approche qui ne puisse pas être soumise aux mêmes critiques. Dans une expérience de co-transfection de plasmide et petit ARN dans laquelle les quantités totales de l'un et l'autre sont fixées, on peut faire varier la proportion d'un plasmide entraîneur et du plasmide indicateur, modulant ainsi le niveau d'expression sans changer les conditions de transfection. Il est possible d'analyser les données pour une gamme de concentration en construction indicatrice qui varie de 1 à 4 (0,125 à 0,5 µg par puits) et d'observer une augmentation proportionnelle de l'expression sans que le silencing en soit affecté (données non présentées). Même si la gamme est d'étendue plus limitée, ces données confortent néanmoins l'idée que le silencing sur une cible imparfaite transfectée n'est pas facilement saturable.

Pour que le complexe miRISC agisse sur un mode catalytique, l'hypothèse la plus simple est qu'il puisse modifier la configuration de l'ARN messenger avant d'être recyclé et de pouvoir réguler un autre ARNm cible. Bien que ceci puisse être réalisé de nombreuses manières, l'observation que la régulation en mode miARN est très souvent associée à une déadénylation des ARNm fournit une piste possible. Si le complexe miRISC induit une déadénylation suffisante, l'ARNm sera décoiffé et dégradé par l'action des nucléases 5' et 3'. On peut donc supposer que le complexe pourra être libéré de son substrat après la fin de la déadénylation ou au plus tard lors de la dégradation de l'ARNm. De fait, dès lors qu'il y a une dégradation des ARNm cibles, il n'existe plus de différence fondamentale entre les modes d'action en mode siARN et en mode miARN, puisque dans les deux cas l'interaction de RISC avec sa cible conduit à la destruction du substrat. Tout au plus peut-on envisager que le mécanisme de dégradation est plus simple dans le mode siARN: coupure endonucléolytique puis dégagement du complexe RISC par des nucléases accessoires comme C3PO (Ye et al. 2011) et dégradation des fragments par les nucléases 5' et 3', une étape qui est probablement facilitée par la localisation du transcrit ciblé dans les P-bodies. Alors que dans le mode miARN il faut d'abord recruter sur l'ARNm cible les déadénylases PAN2-PAN3, CAF-CCR4-NOT afin de permettre le décoiffage et finalement la dégradation par les nucléases 5' et 3'. Le mode miARN introduit donc un peu plus de partenaires pour effectuer la dégradation et de plus l'image de la déadénylation des ARNm dans le cadre de leur demi-vie « naturelle » renvoie à une échelle des temps de l'ordre de la demi-heure pour les messagers instables. Indépendamment des détails du mécanisme, une prédiction de ce modèle est que la régulation de l'expression protéique que nous observons avec nos constructions indicatrices doit être détectable au niveau de l'ARNm. C'est ce que j'ai pu vérifier dans le cadre de notre modèle expérimental (**Fig. 25**).

De manière plus générale, les études récentes sur le mécanisme du silencing en mode miARN sont en faveur d'une dégradation des ARNm cibles. Les analyses à grande échelle dans des cellules mammifères en culture montrent que pour la majorité des gènes endogènes soumis à ce type du silencing, on observe une diminution parallèle de l'abondance des ARNm (Gibbins et al. 2009; Guo et al. 2010). De plus, les interactions entre les protéines TNRC6 et les déadénylases (CCR4-NOT, PAN2-PAN3) ont été en partie caractérisées. Cette capacité à recruter les déadénylases est probablement à l'origine du rôle central des protéines TNRC6 dans le silencing en mode miARN (Braun et al. 2011; Chekulaeva et al. 2011; Fabian et al. 2011; Piao et al. 2010). Ces observations indiquent

que le silencing en mode miARN peut induire une dégradation des ARNm cibles initiée par la déadénylation. Ainsi, on peut envisager que le mécanisme du silencing en mode miARN soit aussi catalytique pour peu que le complexe miRISC ne soit pas altéré de manière irréversible au cours du silencing sur une première cible. Un facteur limitant dans ce mode de silencing sera le délai entre la reconnaissance des molécules cibles par les miRISC et leur déadénylation effective. Plusieurs modèles peuvent être envisagés. Tout d'abord, et à la différence de la déadénylation liée au « vieillissement » des ARNm dans le cytoplasme qui s'étend sur une période longue reflétant en partie l'action distributive de PAN2-PAN3, le recrutement des deux types de déadénylases sur la même molécule d'ARN pourrait conduire à une déadénylation beaucoup plus rapide. En accord avec cette idée on peut noter que je n'ai pas réussi à mesurer la déadénylation des ARNm ciblés par *let-7* dans notre modèle. En d'autres termes, les ARNm détectables après le silencing sont des ARNm non silencés et qui ont la même distribution de queue polyA que les ARNm avant le silencing. Ceci suggère que la population qui est en cours de déadénylation ou qui a une queue polyA courte ne sont que des intermédiaires dans la voie de dégradation et ne s'accumulent pas à des niveaux détectables. Ce résultat est différent de celui observé dans certaines des études sur la déadénylation, mais il convient de remarquer que ces dernières utilisent un système d'impulsion transcriptionnelle pour suivre la décroissance d'une population synchrone (C. Chen et al. 2009). De plus on peut observer que la demi-vie des transcrits ciblés par *let-7* est effectivement courte (< 30 min). Une autre possibilité est qu'une fois que CCR4-NOT a été recruté sur un ARNm, la déadénylation se poursuive que le complexe miRISC soit présent ou non du fait de l'activité processive de ce complexe de déadénylation. Auquel cas les complexes miRISC pourraient être libérés et réutilisés avant même que les ARNm cibles soient dégradés. Le schéma de principe d'une activité catalytique est présenté sur la Figure 45. J'y ai inclus l'idée que le recrutement des ARNm silencés dans les P-bodies favorise leur dégradation même si la présence de P-bodies détectable en microscopie optique n'est pas nécessaire pour un silencing efficace (en mode siARN ou miARN). Finalement, pour réellement pouvoir comparer le mode siARN et le mode miARN, il serait nécessaire de connaître la vitesse de dégradation dans le mode siARN. Si elle est implicitement supposée d'être très rapide à l'image de l'action des nucléases en solution, une expérience réalisée dans le laboratoire par Carole Ribet a montré que, dans les cellules mammifères, la demi-vie d'un ARNm soumis à un silencing efficace en mode siARN est de l'ordre de 10 min. L'ensemble de ces résultats renforce donc l'idée

que les silencings en mode siARN et en mode miARN utilisent tous les deux un mécanisme catalytique avec des caractéristiques cinétiques similaires.

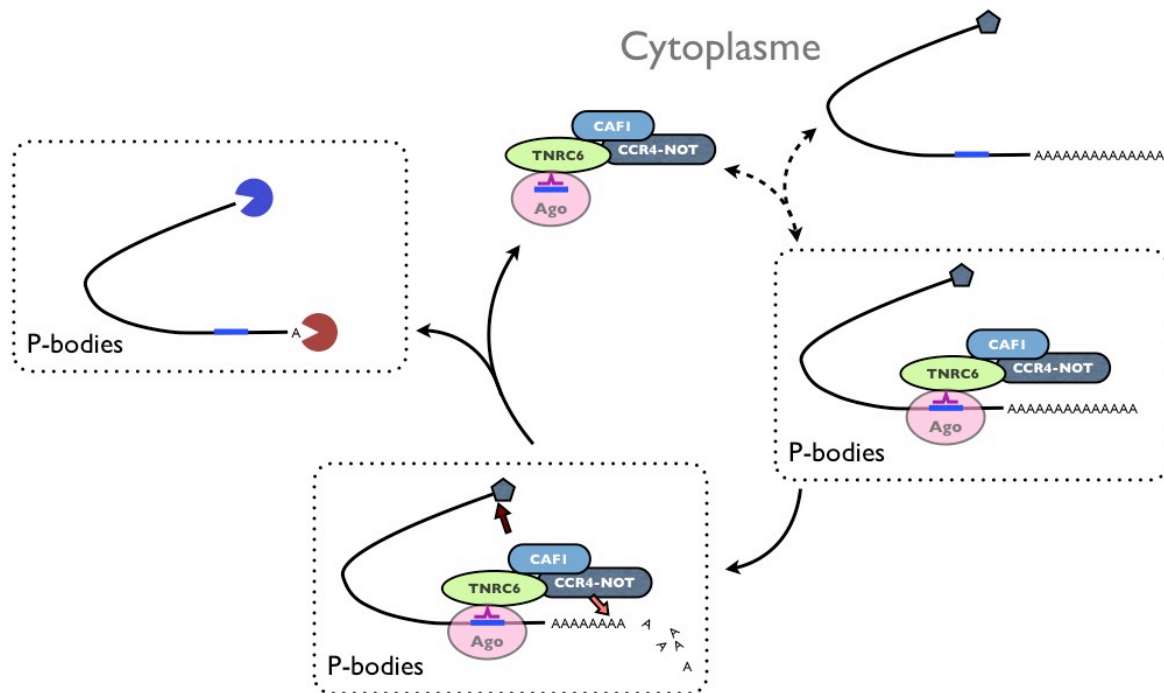


Figure 45, Modèle de dégradation catalytique induit par le silencing en mode miARN.

Les complexes miRISC reconnaissent leurs cibles et les dirigent dans les P-bodies. Les complexes de déadénylation comme CAF1-CCR4-NOT sont recrutés sur la région 3' non codante des ARNm cibles et initient leur déadénylation et leur décoiffage. Une fois que la longueur de la queue poly(A) est suffisamment raccourcie, les miRISC sont libérés à nouveau pour agir sur d'autres cibles. Les facteurs du métabolisme d'ARN présents dans les P-bodies continuent la dégradation des ARNm.

Les constructions indicatrices que nous utilisons pour étudier la régulation en mode miARN contiennent en général plusieurs séquences cibles dans la région 3' non codante du gène rapporteur EGFP, tandis que celles utilisées pour étudier la régulation en mode siARN n'en contiennent qu'une seule. Cependant, par rapport à l'absence de saturation de la régulation, la même conclusion peut être atteinte si l'on analyse le mode miARN sur une seule séquence cible. La question d'un mécanisme catalytique ne dépend donc pas d'une éventuelle coopérativité entre sites. D'ailleurs le nombre de sites n'a qu'un impact faible sur la dose efficace 50. Par contre le silencing maximal en mode miARN est clairement dépendant du nombre de cibles. Dans nos études nous n'avons pas dépassé trois cibles et l'on ne peut donc savoir si l'on a atteint une efficacité limite ou s'il serait possible de l'accroître encore. On peut cependant remarquer que le silencing maximal atteint avec trois cibles imparfaites est du même ordre que celui obtenu avec une cible parfaite. Ce rôle du

nombre de cibles en mode miARN pourrait refléter la question de la stabilité de l'interaction des complexes avec leur cible. D'un point de vue thermodynamique, la fixation du complexe RISC sur une cible parfaite devrait être stable du moins jusqu'à la coupure de la cible. Par opposition, la présence de mésappariements dans le cas d'un site imparfait peut conduire à une interaction transitoire qui pourrait entraîner une dissociation du complexe avant que la régulation ne soit mise en place (dans notre cas la déadénylation). La présence de plusieurs sites augmente de manière additive l'occupation par au moins un complexe, et s'il existe une interaction entre les complexes RISC fixé sur la même molécule, augmente de manière coopérative leur présence.

L'absence de saturation du silencing en mode miARN que nous avons observée (**Fig. 24**) est très différente de ce qui est généralement proposé et de ce qui est observé dans certaines approches expérimentales. Plusieurs éléments peuvent contribuer à ces différences. D'abord, « le silencing en mode miARN » ne définit pas un mécanisme unique comme le montrent les nombreuses controverses sur l'importance relative d'un blocage de la traduction et d'une déstabilisation des ARNm, et ce dans certains cas en utilisant les mêmes constructions indicatrices. Si la vision actuelle tend à définir la déstabilisation comme le mode prédominant du silencing dans les cellules en culture et en réponse à un petit ARN transfecté (Guo et al. 2010), il est clair que d'autres modes d'action sont possibles même dans ce contexte cellulaire. D'ailleurs, l'observation que l'expression de messagers dépourvus de queue polyA peut aussi être régulée par le complexe miRISC sur une cible imparfaite établit que la déadénylation ne représente que l'une des voies possibles de régulation. L'observation que l'isoforme la plus longue de GW182/TNRC6A (connue sous les noms de GW220 ou TNGW1) serait spécifiquement associée à une inhibition réversible de la traduction (sans dégradation de l'ARNm ciblé) fournit un premier élément pour appréhender ce qui contrôle l'importance relative des différents mécanismes de silencing (Castilla-Llorente et al. 2012). Enfin, même la dégradation de l'ARNm cible est vue comme la conséquence d'un blocage initial de la traduction qui, dans ce cas, s'accompagne d'une déadénylation (Béthune et al. 2012; Djuranovic et al. 2012) plutôt que comme la réponse primaire à la fixation du complexe RISC. L'absence de détection d'une population d'ARNm dont le taux de traduction serait diminué (Guo et al. 2010) suggère que la phase de blocage de la traduction s'accompagne rapidement d'une dégradation de telle sorte qu'à l'équilibre on n'observe que deux populations : les ARNm qui ne sont pas affectés (quelle que soit la raison sous-jacente : compartimentation

intracellulaire, absence de transfection du petit ARN dans toutes les cellules ou existence de cellules « résistantes ») et les ARN qui ont été dégradés (évidemment détectés par défaut comme représentant la diminution du nombre de molécules). Ces observations sur un système à l'équilibre sont de nouveau en accord avec une dégradation rapide des ARNm silencés puisqu'ils sont non détectables.

La possibilité d'utiliser des « éponges à miARN » pour diminuer l'activité biologique des miARN est une démonstration indirecte du fait que la régulation est saturable par un excès de substrat (Ebert & Sharp 2010). Comment peut-on réconcilier ces expériences avec l'absence de saturation que nous avons observée ? Plusieurs aspects doivent être pris en compte sur le détail de la démarche expérimentale. Dans notre approche telle qu'elle a été développée jusqu'à présent, le substrat et son miARN régulateur sont tous les deux exogènes et introduits soit simultanément soit à 24 h d'intervalle. Il est probable que cette nature exogène et l'abondance soudaine de molécules biaisent la réponse de la cellule vers ce substrat et que cette situation est assez éloignée de l'équilibre qui est atteint entre les cibles cellulaires et les miARN endogènes. En effet, comme présenté dans l'introduction, il existe dans la cellule plusieurs milliers de molécules de substrats potentiels issus d'au moins une centaine de gènes différents, mais dans la plupart des cas aucun de ces substrats ne représente à lui tout seul une population majoritaire comme c'est le cas pour les cellules avec un fort niveau d'expression de la construction indicatrice. De plus, les conditions d'expression à très fort niveau et en transitoire n'assurent probablement pas le même type de couverture protéique sur des ARNm du gène exogène que sur ceux d'un gène endogène (on peut d'ailleurs noter que les constructions que j'ai utilisées ne comprennent pas d'intron, une situation inhabituelle pour les gènes cellulaires).

Des expériences réalisées récemment par Stanislas Denoeux dans le laboratoire éclairent d'un jour nouveau la question de la compétition dans notre modèle. L'objectif initial était de suivre les deux types de silencing (en mode siARN et miARN) dans la même cellule sur plusieurs substrats d'ARNm contenant soit une cible parfaite soit une cible imparfaite. Afin de pouvoir identifier les substrats, il a donc utilisé des constructions dans lesquelles l'EGFP mais aussi la DsRed (exprimées à partir de plasmides différents) étaient associées à des sites de régulation par des petits ARN (CXCR4 ou *let-7*, parfaits ou imparfaits ; l'expression d'une autre protéine fluorescente, Nir étant utilisée pour contrôler l'efficacité de la transfection et l'activité du promoteur). Si la co-existence de deux types du silencing

induits par **différents** petits ARN ne pose pas de problème particulier, l'introduction de deux types de substrats (cible parfaite ou cible imparfaite) pour le même petit ARN conduit à très forte diminution du silencing sur l'un ou l'autre type de substrat par rapport à la situation où ils sont exprimés séparément. Cette observation indique que, dans nos conditions expérimentales, une saturation de la régulation est possible mais qu'elle nécessite des substrats présentant au moins des différences dans les régions codantes, puisque ces constructions utilisent les mêmes régions 3' non codantes contenant les sites de fixations pour les petits ARN. De manière importante, cette compétition peut être observée entre sites parfaits, suggérant que ce silencing est aussi saturable comme il a été observé chez les plantes ; elle est cependant plus marquée avec des sites imparfaits. Ces observations préliminaires mettent en perspective la notion de compétition. Tout d'abord, il faut supposer que la notion de substrat ne se limite pas à la seule séquence d'interaction avec les petits ARN. Comme il a été évoqué dans l'introduction, il existe un nombre croissant de données sur les interactions (directes ou indirectes) entre les complexes RISC et la couverture protéique d'un ARN messager. Dans la formulation la plus directe, on peut donc envisager qu'il existe des complexes miRISC de spécificité étendue, comprenant par exemple des protéines fixant l'ARN en plus de la protéine Ago et de son ARN guide. Deuxièmement, l'observation d'une diminution du silencing ne peut se comprendre que si les complexes RISC ont une durée de vie limitée qui peut être prolongée par une interaction avec le substrat approprié mais pas avec un autre substrat. Ainsi, dans le cas où un seul type de substrat est exprimé à un fort niveau, sa présence pourrait renforcer les complexes correspondants. Si une stabilisation des complexes miRISC par le substrat a été décrite chez *C. elegans* (Chatterjee et al. 2011), pour l'instant c'est plutôt une déstabilisation des complexes RISC par le substrat qui a été observée chez la drosophile et les cellules de mammifère (Baccarini et al. 2011). Un moyen de réconcilier l'ensemble de ces observations est de considérer que le devenir d'un complexe RISC à la suite de son interaction avec une cible peut-être une déstabilisation ou une stabilisation en fonction de paramètres supplémentaires comme l'interaction avec d'autres régions de l'ARNm. Les observations préliminaires de Stanislas Denoeux fournissent les bases d'une approche expérimentale pour tester ces hypothèses.

II. Variabilité du silencing en mode miARN

Nos études concernant la robustesse de la régulation en mode miARN indiquent que la différence entre les deux types de régulation post-transcriptionnelle induite par les petits ARN n'est pas aussi importante qu'habituellement proposée. Cependant, dans nos études, comme dans l'abondante littérature sur la régulation par les miARN, l'efficacité moyenne du silencing est plus faible en mode miARN qu'en mode siARN. L'observation que le silencing en mode miARN n'est pas actif dans toutes les cellules donne une signification différente de celle classiquement avancée pour expliquer cette différence d'efficacité moyenne. De fait, dans une situation où deux ou trois sites imparfaits sont présents sur un ARNm, le silencing maximum que l'on observe est du même ordre que celui sur un site parfait voire même supérieur. Ainsi dans des conditions comparables à celles observées pour les cibles naturelles de miARN, il n'existe pas une faiblesse intrinsèque du silencing en mode miARN mais une régulation qui le rend inopérante dans une partie des cellules.

A. Découverte des cellules résistantes à la régulation par les miARN

Un avantage de l'approche expérimentale développée dans notre équipe, qui est voisine de celle développée par l'équipe de van Oudenaarden (Mukherji et al. 2011), est la richesse des informations collectées par la cytométrie en flux. De fait, cette abondance de données oblige à choisir une méthode d'analyse en fonction de la question abordée. Dans sa formulation la plus complète cette approche permettrait d'aboutir à l'analyse du silencing au niveau de chaque cellule. En l'état ceci n'est pas directement réalisable dans la mesure où l'on ne dispose que d'une seule donnée au cours du silencing (le plus souvent une mesure à 32 h après l'induction de l'expression) et même si l'on effectuait plusieurs lectures au cours d'une expérience, il ne serait pas possible d'attribuer une identité aux cellules afin de suivre l'évolution de l'expression de la construction indicatrice. J'ai exploré la possibilité de développer une autre approche (la cytométrie sur lame) qui consiste à utiliser la microscopie à fluorescence pour mesurer les intensités fluorescentes sur une cellule et, moyennant un repérage spatial, permettant de l'analyser à plusieurs reprises. Jusqu'à présent cette approche ne s'est pas avérée complètement opérationnelle.

Pour exploiter les données de cytométrie de manière plus approfondie, j'ai donc utilisé l'un des paramètres (l'expression de la DsRed) pour mieux caractériser des populations de

cellules. De ce point de vue, l'utilisation du promoteur bidirectionnel est attrayante dans la mesure où l'on a un accès direct à l'activité du promoteur via l'expression de la DsRed ; il existe cependant un niveau de complexité supplémentaire lié à ces constructions puisque le silencing de l'EGFP induit une activation transcriptionnelle du promoteur. Toutefois dans le cas du silencing en mode miARN cet effet est faible et ne modifie pas les conclusions.

Avant même l'analyse de populations spécifiques, la représentation des données en nuage de points permet d'avoir une vision d'ensemble sur la réponse des cellules. Ainsi, notre approche est bien adaptée pour aborder une question intéressante : est-ce que le silencing par les petits ARN régulateurs se passe de la même manière dans toutes les cellules ? A priori pour répondre complètement à cette question il faudrait disposer d'un système expérimental complètement contrôlé dans lequel les conditions expérimentales seraient identiques dans toutes les cellules. Dans des expériences de transfection transitoire, ceci est évidemment irréaliste et notre approche repose pour une grande part sur une étude comparative du silencing en mode siARN et en mode miARN. Le silencing en mode siARN conduit à un déplacement de l'ensemble du nuage de point, ce qui indique une efficacité du silencing comparable dans toutes les cellules (du fait de l'utilisation d'une échelle logarithmique, des distributions parallèles indiquent une même efficacité de silencing en pourcentage). Par contre, pour un silencing en mode miARN l'image obtenue est complètement différente avec deux populations identifiables (**Fig. 27**) : l'une qui semble avoir un comportement voisin de celui des cellules soumises à un silencing en mode siARN et l'autre qui est pratiquement non affectée par le silencing. Comme le même petit ARN est utilisé pour induire les deux silencing, on peut déduire de ces observations qu'alors que le silencing en mode siARN se caractérise par une réponse homogène au sein de l'ensemble des cellules, il n'en est pas de même pour le mode miARN.

Une première interprétation de ce résultat serait qu'il reflète des différences dans l'efficacité de transfection du petit ARN : en supposant comme cela est couramment fait qu'il faille une quantité plus importante de petit ARN pour assurer un silencing en mode miARN, les cellules où le silencing n'est pas observé pourraient avoir reçu une dose plus faible de petit ARN (mais néanmoins suffisante pour assurer un silencing en mode siARN). Cette interprétation est cependant peu probable compte tenu de nos résultats précédents qui indiquent que les doses efficaces 50 sont très proches pour les deux modes de silencing. Nous avons de plus étudié directement la pénétration des petits ARN dans les cellules et

observé qu'il n'existait pas de différence dans la quantité de petit ARN détecté dans les cellules compétentes ou résistantes pour le silencing (**Fig. 28**). Ainsi, l'absence de silencing ne peut pas être attribuée à un défaut de transfection du petit ARN. Comme de plus on n'observe pas de cellules résistantes au silencing en mode siARN, l'ensemble de ces observations suggère que la différence entre les deux silencing s'établit après l'assemblage du complexe RISC minimal constitué du petit ARN et de la protéine Ago2. Nous avons d'ailleurs observé que dans notre modèle expérimental, le silencing en mode miARN dépend principalement de la protéine Ago2 ce qui justifie de pousser la comparaison jusqu'au niveau des complexes RISC.

Une autre donnée en faveur d'une régulation de l'activité des complexes RISC vient de l'analyse du comportement des cellules compétentes et résistantes au cours du temps. Lorsque l'on trie ces populations et qu'on les remet en culture, on observe, au sein des deux sous-populations, une réponse hétérogène au silencing. La notion de compétence ou de résistance n'est donc valable qu'à un moment donné de la culture et ne se maintient pas au cours du temps. De plus, on peut observer que la population initialement résistante est capable de mettre en place un silencing après avoir été triée et ce sur la base du stock de petit ARN initialement transfecté (**Fig. 36**). Ceci ne démontre pas directement que ce sont les complexes RISC incompetents pour le silencing qui le deviennent plus tard, mais est compatible avec cette hypothèse. En tout cas, ces observations montrent qu'il n'existe pas deux sous-populations distinctes au sein de la culture HEK293 Tet-On, mais que certaines cellules peuvent à un moment donné être soit compétentes soient résistantes au silencing en mode miARN.

Toutes nos observations ont été faites dans les cellules HEK293 Tet-On dans lesquelles a été développée l'approche expérimentale. Outre la présence du transactivateur rtTA, les cellules HEK293 Tet-On présentent un avantage important pour nos études du fait de leur très grande sensibilité à la transfection. On peut ainsi co-transfecter le plasmide indicateur et le petit ARN dans toutes les cellules et ce avec plusieurs techniques de transfection. Nous avons principalement utilisé la technique au phosphate de calcium du fait de sa très grande efficacité de co-transfection (plusieurs plasmides et plusieurs petits ARN) mais des résultats voisins ont été obtenus avec la lipofectamine ou HiPerfect. En principe, le même type d'analyse sur l'efficacité du silencing peut être réalisé dans d'autres cellules, même si la transfection est moins efficace. C'est ce que j'ai fait dans le cas des cellules U2OS Tet-

On et de la lignée HeLa (**Fig. 31 et 32**). Dans ces deux modèles les profils en nuage de points sont différents des précédents mais on peut cependant observer la présence d'une population résistante. A ce stade je n'ai pas encore directement montré que la transfection du petit ARN dans ces lignées cellulaires était comparable entre les cellules compétentes et résistantes, mais l'observation d'un silencing en mode siARN suggère que comme dans les cellules HEK293 Tet-On, il s'agit d'une régulation de l'activité des complexes RISC. Ce type de vérification sera effectuée à l'avenir en reprenant la même stratégie que nous avons utilisée chez les cellules HEK293 Tet-On.

Nous avons donc observé l'existence d'une population résistante au silencing en mode miARN et seulement en mode miARN dans trois lignées cellulaires classiques. Il est trop tôt pour évaluer si cette caractéristique de la régulation en mode miARN est un phénomène courant parmi les différents types cellulaires et plus de lignées cellulaires en culture devront être testées. De ce point de vue, l'utilisation des constructions CMV permet de s'affranchir de la présence du transactivateur et des caractéristiques spécifiques des constructions bidirectionnelles. Mais pour que les données soient analysables de manière convaincante, il est nécessaire d'obtenir des efficacités de co-transfection suffisamment élevées (l'utilisation du promoteur bidirectionnel permet de n'utiliser qu'une construction indicatrice au lieu de deux). Dans mes premiers essais dans des cellules hématopoïétiques, je n'ai pas réussi à conclure sur l'existence ou non d'une population résistante. Une faible efficacité de transfection n'empêche pas de mesurer un silencing dans le cas des constructions luciférase du fait de la très grande sensibilité de la détection de l'activité enzymatique, mais rien ne permet de connaître la représentativité des valeurs obtenues par rapport à l'ensemble des cellules.

En absence de données sur l'homogénéité du silencing, il n'est pas possible de conclure uniquement sur la base des efficacités moyennes que le silencing est moins efficace en mode miARN qu'en mode siARN. Dans le cas de HEK293 Tet-On, nos données montrent que la différence observée dans les valeurs moyennes est principalement due à l'existence d'une population résistante. Par exemple, si nous comparons la **Figure 20D** et la **Figure 29D**, la prise en compte des cellules résistantes au silencing dans l'analyse des valeurs moyennes (**Fig. 20D**) masque considérablement l'efficacité réelle du silencing en mode miARN induite par une seule cible (**Fig. 29D**).

La découverte de cellules résistantes au silencing en mode miARN introduit une différence essentielle entre les deux modes de silencing tout en permettant d'intégrer nos autres résultats qui indiquent une grande similarité entre eux. En terme de mécanisme, la présence de quelques mésappariements au centre de la région d'hybridation entre le brin guide de petit ARN et sa cible rend impossible la coupure par l'activité endonucléolytique de Ago2. En conséquence, le silencing en mode miARN dépend du recrutement de cofacteurs. Cette étape de recrutement ou l'activité de ces cofacteurs constitue a priori la cible plausible pour la régulation observée du silencing en mode miARN. Bien qu'il n'existe pas vraiment de données sur l'impact de ces cofacteurs sur le silencing en mode siARN, on peut raisonnablement supposer que l'activité endonucléolytique est peu affectée par eux d'où la régulation différentielle observée entre les deux modes de silencing.

B. Origine des cellules résistantes

Ce qui a initialement attiré notre attention dans les cellules HEK293 Tet-On, c'est l'existence de deux populations cellulaires distinctes, l'une avec un silencing très efficace et l'autre sans silencing apparent (**Fig. 27B**). Au lieu d'une modulation de l'efficacité du silencing en mode miARN, ces résultats suggèrent plutôt un contrôle de type tout ou rien. Il est évidemment impossible d'exclure l'existence de cellules dans lesquelles le silencing serait partiellement actif, et dans certains jeux de données on peut supposer qu'elles sont présentes, mais elles sont globalement moins abondantes que les cellules où le silencing n'est pas visible. Ainsi il semble exister une régulation forte du silencing en mode miARN.

Nos résultats montrent que les cellules résistantes sont plus abondantes chez les cellules de petite taille et en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Ces observations sont cohérentes avec le fait que la résistance au silencing en mode miARN ne soit pas une caractéristique permanente des cellules. Pourtant, même s'il existe un impact du cycle cellulaire sur le silencing en mode miARN (**Fig. 37, 40 et 41**), il est aussi apparent que le cycle ne suffit pas à définir l'état de compétence ou de résistance des cellules. Ainsi, nous n'avons observé qu'un léger enrichissement des cellules résistantes en phase G0/G1, alors qu'elles sont aussi détectables dans les autres phases du cycle.

Un couplage direct entre le cycle et le silencing en mode miARN pourrait être dû à l'expression de GW182. Il a été observé par les groupes de Esthivoy et Chan (Z. Yang et al. 2004) que l'expression de GW182 varie au cours du cycle cellulaire, une conséquence

directe de cette régulation étant la variation du nombre et de la taille des P-bodies avec un nombre plus faible en début de G1. Etant donné que GW182 et les P-bodies jouent un rôle important dans le silencing en mode miARN, cette observation est en accord avec l'hypothèse que le cycle cellulaire participe à la régulation du silencing. Toutefois ces données n'ont pas été confirmées depuis ni été étendues aux paralogues de GW182 (TNRC6 B et C). De plus, comme indiqué plus haut, le lien avec le cycle ne semble aussi direct que celui que pourrait créer une régulation forte des protéines TNRC6 au cours du cycle. Il faut cependant prendre en compte une difficulté dans l'interprétation des résultats, liée à la durée des mesures du silencing. Ceci est dû à l'activation assez lente de l'expression par le transactivateur rtTA. Plusieurs facteurs contribuent à cette cinétique : la mise en place de la transcription, la maturation des protéines fluorescentes (particulièrement lente pour la DsRed même si nous avons utilisé la DsRed « express », $t_{1/2} < 12$ H), la nécessité d'une accumulation suffisante des protéines pour une mesure précise en cytométrie. En pratique, l'expression des protéines fluorescentes commence à être détectable environ 12 h après le début de l'induction et dans les expériences présentées ici la durée d'induction est en général de 32 h. Les mesures de fluorescence sont donc en fait le résultat de l'expression des constructions indicatrices sur une période de l'ordre de 20 h (si l'on considère que les 12 premières heures d'induction contribuent peu à la fluorescence détectée). Comme le cycle cellulaire des cellules HEK293 dure une vingtaine d'heures, la mesure du silencing est en fait une intégration de la régulation sur presque un cycle. Ceci pourrait expliquer pourquoi il n'existe pas un lien apparent très fort entre l'efficacité du silencing et le cycle cellulaire, mais par contre conduit à la prédiction que le silencing devrait être atténué et non pas supprimé dans une grande partie des cellules. L'ensemble de ces données plaide donc plutôt pour l'existence d'une régulation du silencing qui ne résulte pas directement de la position dans le cycle, mais dont la probabilité de mise en place est en partie liée à la position dans le cycle.

A ce jour, de nombreuses protéines ont été impliquées dans le silencing en mode miARN. En plus des protéines Ago et des protéines GW182 (TNRC6A, B, C), le complexe CCR4-NOT-CAF1, la PABP, la protéine EDD, la protéine GIGYF2 ... ont été montrées participer au silencing et identifiées comme des composants de miRISC (Chekulaeva et al. 2011; Fabian et al. 2011; Fabian et al. 2009; Su et al. 2011). Si l'on peut envisager que l'activité de ces protéines soit régulée par exemple par des modifications post-transcriptionnelles, l'importance de la régulation que nous avons observée suggère plutôt une régulation de

l'ensemble du complexe miRISC. On peut noter qu'en plus des facteurs protéiques listés, certains organelles jouent un rôle important dans la mise en place du silencing en mode miARN. Par exemple, les MVBs (**M**ulti**V**esicular **B**odies, corps multivésiculaires) pourraient servir de sites d'assemblage ou de recyclage des complexes miRISC (Gibbings et al. 2009). Plus récemment, il a été montré que la protéine prion PrP^C pourrait être impliquée dans ce type de silencing (Gibbings et al. 2012). Par ailleurs, nos travaux avec l'équipe de D. Weil ont mis en évidence l'importance de l'activité mitochondriale et probablement d'une interaction directe entre les P-bodies et les mitochondries pour l'assemblage du complexe miRISC et la mise en place du silencing en mode miARN (Huang et al. 2011). On peut donc envisager que l'assemblage d'un complexe miRISC à partir du complexe siRISC minimal dépende de la physiologie cellulaire par exemple à travers un contrôle des interactions nécessaires à la maturation de miRISC. Par opposition, l'assemblage du siRISC minimal ne semble pas être soumis aux telles régulations.

L'idée d'une régulation de l'activité des miARN n'est pas complètement nouvelle et a déjà été proposée à travers quelques études. Toutefois celles-ci ne portaient pas sur le silencing en tant que tel mais sur la biogenèse des miARN. Au-delà de la transcription des gènes de miARN, leur maturation nécessite la participation de plusieurs facteurs soit génériques (Drosha, Dicer, Ago, etc.), soit spécifique de certains miARN (RNA proteins). Il a été observé que dans une culture cellulaire, la biogenèse des miARN est stimulée par les contacts entre cellules (Hwang et al. 2009). Bien que nos expériences soient en première analyse indépendantes des voies de maturation des miARN endogènes, puisque nous transfectons des miARN matures, ces résultats ont l'intérêt d'attirer l'attention sur le rôle des contacts cellulaires. Or l'une des caractéristiques des cellules HEK293 en culture est de pousser sous forme d'amas cellulaires très compacts, ce qui pourrait définir deux populations cellulaires distinctes : celles qui sont au centre des amas et celles qui sont en bordure. Si l'on étend à l'activité de miRISC les données sur la maturation des miARN, les cellules situées au milieu des amas pourraient avoir un silencing plus actif que celles situées en bordure. Si nous cultivons des cellules pour qu'elles forment plus d'amas de petite taille par une dilution de la culture cellulaire sur un support d'une plus grande surface, on peut observer une augmentation du pourcentage de cellules résistantes. Ces observations devront être validées par des approches plus adaptées en appliquant les techniques de microcopies fluorescentes accompagnées de l'acquisition et l'analyse d'image à grande échelle, ce type d'approches pourrait nous fournir des informations

presqu'aussi riches que la cytométrie en flux sur les niveaux d'expression tout en préservant l'information sur l'organisation spatiale au sein d'un agrégat cellulaire.

L'idée que les contacts cellulaires pourraient être impliqués dans l'efficacité du silencing souligne l'importance de réaliser des études sur des cellules en suspension comme les cellules du système hématopoïétique. Dans les quelques expériences effectuées, nous n'avons pas obtenu des données conclusives principalement à cause d'une efficacité de co-transfection particulièrement faible. Cette situation pourrait être améliorée en construisant des transfectants stable dans des lignées en suspension. En fonction du résultat, deux grandes situations sont possibles : soit on ne détecte pas de cellules résistantes en accord avec un rôle essentiel des contacts cellulaires, soit au contraire une telle population existe aussi. Il est intéressant de noter que si les U2OS, d'origine mésenchymateuse, ne présentent pas de contacts structurés comme les cellules épithéliales, on peut néanmoins détecter une population résistante. Ainsi, les contacts comme les jonctions adhérentes des cellules épithéliales ne sont probablement pas directement impliqués dans la régulation du silencing en mode miARN mais participent à l'établissement de l'état résistant de la cellule.

Les observations présentées dans ce manuscrit abordent des questions comme le silencing en mode miARN est-il vraiment une régulation « douce » comme il est souvent proposé. Comment ce silencing post-transcriptionnel est-il régulé *in vivo* et par quels mécanismes ? Ce sont des questions d'une grande importance pour la compréhension de la régulation par les miARN et de leur rôle biologique.

PARTIE IV. MATERIELS ET METHODES

I. Biologie Cellulaire

A. Lignées cellulaires

Une grande majorité des expériences discutées dans ce manuscrit a été effectuée dans la lignée cellulaire HEK293 Tet-On. La lignée HEK293 a été établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain au début des années 1970. La lignée HEK293 est fréquemment utilisée comme système modèle de cellules en culture du fait de sa croissance rapide et de sa très grande efficacité de transfection. Ces cellules sont efficacement transfectables par presque toutes les techniques existantes et en particulier par la méthode du précipité de phosphate de calcium et par la lipofectamine. La lignée HEK293 Tet-On est une lignée dérivée de HEK293 qui est commercialisée par Clontech ©. Il s'agit d'un clone stable transfecté avec le gène rtTA, obtenu par sélection avec la généticine (G418). rtTA est une molécule de fusion entre une version mutée du répresseur de la tétracycline et le domaine transactivateur de VP16. Contrairement au répresseur sauvage, la fixation du répresseur muté sur son site au niveau de l'ADN dépend de la présence de tétracycline. Aussi l'addition de tétracycline (ou de préférence de doxycycline) dans le milieu de culture entraîne la fixation du transactivateur sur ses séquences cibles, induisant l'activité des séquences promotrices correspondantes. En pratique, l'induction est progressive au cours du temps et en fonction de la dose de doxycycline. La dose que nous utilisons (1 µg/mL) assure une réponse maximale avec une activité importante du promoteur après 24 h d'induction. Une limitation des cellules HEK293 est leur faible adhérence au plastique, ce qui fait que pour les transfecter, on est obligé d'attendre 48 h après leur ensemencement. Par contre, cette faible adhérence est un avantage pour l'analyse en cytométrie puisqu'il est relativement facile d'obtenir une suspension cellulaire par ajout d'un chélateur de calcium.

Les cellules U2OS Tet-On ont été dérivées de la même manière par transfection de rtTA dans la lignée U2OS. Les cellules U2OS sont obtenues à partir des cellules d'ostéosarcome. Par rapport aux cellules HEK293, l'efficacité de transfection de cette lignée est plus faible, mais leur adhérence au plastique est plus forte l'on peut les transfecter 24 h après leur ensemencement.

La lignée HeLa a été obtenue à partir des cellules adénocarcinome du col utérin il y a plus de 50 ans, en fonction des nombreuses cultures présentes dans les laboratoires, elle présente une morphologie souvent intermédiaire entre une cellule épithéliale et mésenchymateuse. L'efficacité de transfection de cette lignée est limitée par la méthode de phosphate de calcium, son adhérence au support de culture est forte.

B. Culture cellulaire

Toutes les lignées sont cultivées dans une étuve humidifiée à 37°C et à 5% de CO₂. Pour le maintien de la culture, les cellules sont divisées lorsqu'elles atteignent 80% confluence par dissociation avec une solution de trypsine-EDTA et réensemencées à des dilutions variant de 1/6 à 1/20 en fonction de la durée prévue de la culture. Les cellules sont cultivées dans du DMEM (avec 4,5 g/L glucose et sans pyruvate, Gibco BRL®) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 100 unités/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Pour maintenir la pression de sélection sur les clones stables des cellules HEK293 Tet-On sélectionnés dans le laboratoire qui expriment les plasmides rapporteurs de la série pBiFluo et l'expression des transgènes inducible, les clones stables sont maintenus dans le milieu de culture décrit ci-dessus avec 1 µg/mL de puromycine et 1 µg/mL de doxycycline en complément.

C. Transfection

a. Transfection au phosphate de calcium

La transfection par le phosphate de calcium a été mis au point par S. Bachetti et F.L. Graham en 1977. Une solution saline tamponnée par l'HEPES (HEPES-buffered saline solution – HeBS) doublement concentrée et contenant des ions phosphate est combinée avec une solution de chlorure de calcium contenant les acides nucléiques à transférer (petits ARN et/ou plasmide). Lorsque ces deux solutions sont combinées, il se forme un fin précipité de phosphate de calcium, dans lequel sont intégrés les acides nucléiques présents dans la solution. La suspension contenant le précipité est alors ajoutée aux cellules à transférer (habituellement une culture cellulaire monocouche). Par un procédé non entièrement compris, les cellules incorporent le précipité contenant l'ADN ou le petit ARN (les ions Ca²⁺ masquent la polarité négative de l'ADN lui permettant d'entrer dans le

MATERIELS ET METHODES

cytoplasme de la cellule). Dans les cellules HeLa, et encore plus dans les cellules HEK293, la technique au phosphate de calcium est très efficace et permet d'obtenir l'expression du gène d'intérêt dans pratiquement toutes les cellules. De plus, la co-transfection (de deux ou trois plasmides, ou d'un plasmide et d'un petit ARN) est très efficace.

Pour les transfections au phosphate de calcium, les cellules sontensemencées la veille à 5×10^5 /boîte Φ 85 mm, ou 1×10^5 /puits de plaque de 12 puits, ou 5×10^4 /puits de plaque de 24 puits. Au minimum deux heures avant la transfection, le milieu est renouvelé.

Pour les boîtes Φ 85 mm, les siARN et les plasmides sont dilués dans une solution de Tris/EDTA diluée 10 fois (1 mM pH 7,8 et d'EDTA 0,1 mM dans un volume final de 220 μ L (50 μ L pour chaque puits des plaques de 12 puits, 25 μ L pour chaque puits des plaques de 24 puits). Puis sont ajoutés 30 μ L de CaCl_2 2M (6 μ L pour chaque puits des plaques de 12 puits ; 3 μ L pour chaque puits des plaques de 24 puits) et la solution est mélangée au vortex. Puis il est ajouté doucement un volume égal de HBS 2 x et la précipitation est déclenchée en initiant le mélange de deux solutions en faisant par deux fois des bulles au fond du tube avec une micropipette. Après 20 min à température ambiante, le précipité est ajouté sur les cellules (500 μ L pour une boîte de 85, 100 μ L pour un puits d'une plaque de 12). Pour les analyses à 24 heure (h) ou plus après la transfection, le milieu est renouvelé 16 heures après l'ajout du précipité.

Solutions utilisées pour la transfection :

CaCl_2 2M

HBS 2X (le pH est ajusté à 7,05 avec une solution de NaOH)

HEPES	50nM
NaCl	280 nM
KCl	10 nM
Na_2HPO_4	1,5 nM

b. Transfection par Lipofectamine 2000

Les transfections à la lipofectamine (Invitrogen©) ont été faites dans des boîtes de 35 mm ensemencées avec 10^5 cellules la veille (pour les cellules HeLa) et 48h avant la transfection pour les cellules HEK293. Le jour de la transfection, les siARN sont dilués dans 50 μ L de

Opti-MEM I sans ajouter de sérum, mélangé et 1 μ L de lipofectamine 2000 puis sont mélangés avec 50 μ L de Opti-MEM I. Après cinq minutes sous la hôte, les deux solutions sont mélangées doucement. 20 min après, les 100 μ L de mélange sont ajoutés dans la boîte. Les milieux de culture peuvent être changés au-delà de 6 heures post-transfection.

D. Construction de clones stables HEK293 Tet-On

Les plasmides indicateurs ont été transfectés dans les cellules HEK293 Tet-On par la méthode au phosphate de calcium avec le plasmide de résistance à puromycine pBSpac. Le ratio molaire plasmide indicateur : pBSpac est 4 : 1 (1 μ g/ml : 200 ng/ml dans les cas de série pBiFluo) pour favoriser la probabilité que les clones résistants aient intégrés le plasmide indicateur. Un lavage des cellules transfectées est effectué le lendemain de la transfection afin d'enlever le précipité de phosphate de calcium. 1 jour après, la sélection des clones résistants à la puromycine est mise en place par l'ajout de 1 μ g/mL de puromycine dans le milieu. Les cellules sont cultivées sous la pression de sélection pendant 7 à 10 jours, la sélection est ensuite enlevée pour que les clones résistants à la puromycine puissent proliférer plus activement. Les clones visible (Φ plus de 2 mm) dans la boîte de culture sont transférés dans une plaque 24 puits dans un milieu sans sélection pendant 3 à 4 jours. La puromycine est alors de nouveau ajoutée pour vérifier la résistance des clones ainsi sélectionnés. Les clones résistants à la puromycine sont ensuite analysés par cytométrie en flux afin de déterminer le profil d'expression des protéines fluorescents. Les clones positifs ayant un profil d'expression convenable sont congelés à -180 °C.

E. Détection des protéines fluorescentes par cytométrie en flux

Les constructions indicatrices utilisées permettent l'expression de l'EGFP et de la DsRed. La cytométrie en flux permet une mesure quantitative de l'expression de ces protéines au niveau de chaque cellule. De plus comme il s'agit de protéines ayant des fluorescences intrinsèques, il n'est pas nécessaire de perméabiliser ou de fixer les cellules. Pour disposer d'un nombre suffisant de données exploitables, la lecture est faite sur 50 000 à 100 000 cellules, d'où le choix d'utiliser des plaques 12 puits dans lesquelles 10^5 cellules sontensemencées.

a. Préparation des échantillons

Pour les plaques 12 puits : après rinçage au PBS, les échantillons cellulaires sont repris dans 400 μ L de PBS 1X contenant 15% de tampon de dissociation cellulaire (GIBCO). Il s'agit d'un milieu tamponné sans Ca^{++} et contenant une quantité non spécifiée de chélateur de calcium. Les cellules sont alors détachées en pipetant vigoureusement la solution avec une pipette P1000, puis transférées dans un tube sur la glace (tube polystyrène 5 mL pour analyse avec les cytomètres Becton Dickinson ou format libre pour le cytomètre Accuri, par exemple tube Eppendorf de 1.5 mL). Les échantillons peuvent être gardés dans la glace et à l'abri de la lumière pendant quelques heures sans que les résultats soient affectés. Les cellules HeLa ou U2OS sont préalablement détachées avec de la trypsine avant d'être reprises dans la solution de dissociation décrite ci-dessus.

b. Protocoles d'analyse

i. Analyse en deux couleurs : EGFP et DsRed

Acquisition

Pour analyser l'expression de l'EGFP et de la DsRed à partir des constructions indicatrices, nous avons utilisé l'excitation par le premier laser (488 nm) et les deux premiers détecteurs de fluorescence (FL1 : 533 + 15 nm et FL2 : 585 + 20 nm). Cette combinaison est bien adaptée à la détection de l'EGFP (excitation max : 488 nm, émission max : 509 nm) et un peu moins bien à celle de la DsRed express (excitation max : 557 nm, émission max : 579 nm) puisque l'excitation à 488 nm n'est que d'environ 50 % de l'excitation maximale. La lecture est faite sans compensation pour les passages d'une fluorescence sur l'autre (la compensation sera faite à posteriori au cours de l'analyse des données afin de vérifier que les conclusions ne dépendent pas fortement de la valeur utilisée pour la compensation). Pour chaque échantillon, nous avons analysé au minimum 5×10^4 cellules avec un seuil sur la diffusion vers l'avant afin d'éliminer les débris les plus petits dès l'acquisition. Une difficulté est que les cytomètres « classiques » (par exemple BD FACScan ou FACSCalibur), ne peuvent analyser que sur une gamme de quatre ordres de grandeur. De plus, compte tenu de la saturation des détecteurs observée aux signaux les plus forts cette gamme exploitable se réduit à 3.5 décades. Or la gamme de signaux que nous observons entre les cellules non transfectées (autofluorescence) et les plus forts expresssurs après induction par la doxycycline est proche de 5 décades. Aussi sur les cytomètres BD, nous

avons procédé à deux lectures avec des réglages différents de sensibilité afin de couvrir l'ensemble des niveaux d'expression (lecture « haute » et « basse » sensibilité). Le cytomètre Accuri permet une quantification des signaux sur 7 décades, par contre il n'est pas prévu de changer la sensibilité des détecteurs. Cette configuration fixe a l'avantage de rendre l'utilisation immédiate mais s'est avérée limitante dans notre cas puisque les signaux les plus forts dépassaient la sensibilité de l'appareil. Aussi avons-nous dû utiliser des filtres neutres pour atténuer les signaux de 10 ou 100 fois selon les cas.

Analyse

Pour les données acquises sur les cytomètres BD nous avons utilisé le logiciel Weasel (Walter and Eliza Hall Institute, Melbourne). Pour celles acquises sur l'Accuri nous avons utilisé le logiciel intégré (CFlow plus) qui permet de traiter les données sur une gamme de sept ordres de grandeur. Dans les deux cas, l'analyse est menée de la même manière avec tout d'abord une sélection sur la diffusion qui permet d'éliminer les cellules mortes, les débris ou les agrégats. En général au moins 80% des événements sont retenus et les valeurs finales ne varient pas fortement en fonction du choix de la sélection sur le profil de diffusion. Dans l'analyse de base nous avons retenu deux types de données pour définir l'expression moyenne : 1) la valeur moyenne globale de la fluorescence dans les canaux FL1 et FL2 obtenue sur la lecture à basse sensibilité, 2) ou les valeurs moyennes obtenues en utilisant un seuil pour la fluorescence de la DsRed (FL2 > 0). En effet, la quantification des signaux est faite de manière discrète sur 256 niveaux et le premier est défini comme étant 0. Le niveau 0 en cette échelle correspond à la valeur 1 en échelle logarithmique, alors le seuil ainsi défini correspond à DsRed > 1. Comme ces cellules représentent une part importante de la population, leur inclusion dans l'analyse est peu informative et l'introduction d'un seuil permet de ne pas en tenir compte. En fonction du contexte, d'autres analyses ont été effectuées avec des sélections sur des sous populations permettant de calculer les valeurs moyennes de fluorescence et le nombre de cellules.

Compensation

Le réglage de la compensation a été défini en utilisant des cellules transfectées uniquement avec le vecteur CMV-EGFP ou CMV-DsRed afin de mesurer le passage d'une fluorescence dans l'autre canal. Comme attendu, pour des réglages « standards » (avec une sensibilité équivalente pour les deux canaux) le passage du signal de l'EGFP dans le canal

de la DsRed (~ 20 %) est beaucoup plus important que le passage inverse (~ 2 %). Toutefois, du fait du manque de linéarité des détecteurs, il n'est pas possible de compenser correctement les signaux à tous les niveaux d'expression. Cette limitation ne devient gênante que lorsque les signaux sont fortement déséquilibrés, par exemple pour mesurer précisément l'expression résiduelle après silencing. Dans le cas du cytomètre Accuri, une compensation satisfaisante peut être obtenue sur l'ensemble de la gamme (le canal FL1 = - 7.9 %FL2 ; le canal FL2 = -6.6 % FL1).

ii. Analyse en trois couleurs : EGFP, DsRed et marquage Cy5 des siARN

Pour analyser la transfection des petits ARN (marqués par le fluorochrome Cy-5, Sigma Aldrich) les cellules sont analysées par cytométrie en flux en utilisant le canal FL4 (excitation à 640 nm et détection à 675 + 12.5 nm) pour détecter la fluorescence des siARN (Cyanine 5 : $Ex_{max} = 649$ nm, $Em_{max} = 666$ nm), compensation : FL3= - 6 % FL2.

iii. Analyse en une couleurs : analyse du cycle cellulaire par 7-AAD

Les cellules sont collectées et lavées 2 fois dans le PBS, elles sont ensuite fixées et perméabilisées pendant 10 min à - 20 °C ou à la nuit à 4 °C avec de l'éthanol absolu pré-refroidi à -20 °C. Les cellules fixées sont ensuite lavées de nouveau pour enlever l'éthanol et reprises dans PBS à raison de 5 000 à 10 000 cellule/ μ L. 1/5 v/v de 7-AAD (Beckman Coulter, A07704) est mélangé avec la suspension des cellules. Les cellules sont incubées en présence de 7-AAD pendant 15 à 20 mn à température ambiante, à l'abri de la lumière. A la fin de l'incubation, 5 volume de PBS sont ajoutés dans la suspension cellulaire et les cellules ainsi colorées sont analysées par la cytométrie dans un délai de moins d'une heure par le canal FL3 (excitation à 635 nm et détection > 660 nM). 7-AAD : 7-Amino-Actinomycin D, $Ex_{max} = 546$ nm, $Em_{max} = 655$ nm (couplé à l'ADN).

F. Tri des cellules

Les cellules HEK293 Tet-On soumises au tri sont collectées dans des tubes polystyrène 5 mL utilisés pour des analyses par cytométrie à raison de 10 millions cellules/mL dans le milieu de culture classique avec 10 μ g/mL néomycine et 100 unités/mL DNase en complément. Les cellules sont incubées dans la glace à l'abri de la lumière avant et après le

tri. Les cellules sont récoltées dans le milieu de culture avec 20 % SVF dans la glace. Le tri a été effectué sur un trieur FACSDiva (BD) avec l'aide de Dr. Denis CLAY (U972 Inserm).

II. Biologie moléculaire

A. Plasmides

Tous les plasmides rapporteurs sont produits dans la souche bactérienne Library Efficiency DH5 α (Invitogen) et purifier avec le kit Maxiprep de Nucleobond ou Qiagen.

a. Construction indicatrice pBiFluo et dérivés

Le vecteur pBiFluo a été dérivé du vecteur pBiFluo-Glo initialement construit par Maria-Antonietta Buccheri. Celui-ci avait été obtenu par intégration dans un plasmide contenant un promoteur bidirectionnel régulé par la tétracycline (pBI, Clontech), les séquences de la DsRed Express (Clontech) et d'un gène de fusion entre l'EGFP et la β -globine de lapin (contenant les deux introns). La digestion du plasmide pBiFluo-Glo par BglII permet d'exciser la région β -globine et ainsi après re-ligation d'obtenir pBiFluo (Fig. M1A). L'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) diffère de la protéine initiale de la méduse (*Aequorea victoria*) par deux mutations (F64L et S65T) qui améliorent son repliement et augmente le rendement de fluorescence tout en déplaçant le spectre d'excitation (Ex_{max} de 395 à 488 nm) vers des valeurs proches de celles des instruments habituellement utilisés. La DsRed est une protéine tétramérique issue d'un corail (*Discosoma*) capable de fluorescer dans le rouge. Comme la GFP sauvage, la DsRed a des problèmes de repliement qui peuvent être en partie contournés par l'introduction de mutations. La DsRed express est un variant qui a une maturation plus rapide dans les cellules de mammifère, néanmoins son expression sous une forme fonctionnelle est plus lente que celle de la GFP.

Afin de pouvoir insérer de nouvelles séquences dans le plasmide pBiFluo, un linker ayant deux extrémités BglII a été introduit dans le site BglII de pBiFluo (situé dans la région 3' non traduite de la GFP, Fig. M1A).

La séquence du linker est la suivante (5' >> 3'):

GATCTTAGCTAGCCAGACTGTACCCATCCCAAACGACCCTTAAGGCAGCGGGCCCACGCGTTAA

Les sites AflII et ApaI qui sera servis pour l'insertion des séquences cibles pour les petits ARN régulateurs sont soulignés.

Le linker contient un codon stop (TAG pour l'insertion sens et TAA pour l'insertion antisens) en phase avec l'EGFP, chaque codon stop est en amont (selon le sens d'insertion) des sites de restriction (AflII et ApaI) qui servent pour l'intégration des sites d'hybridation, les sites d'hybridation seront donc placés en aval du codon stop quelque soit l'insertion du linker, sens ou antisens.

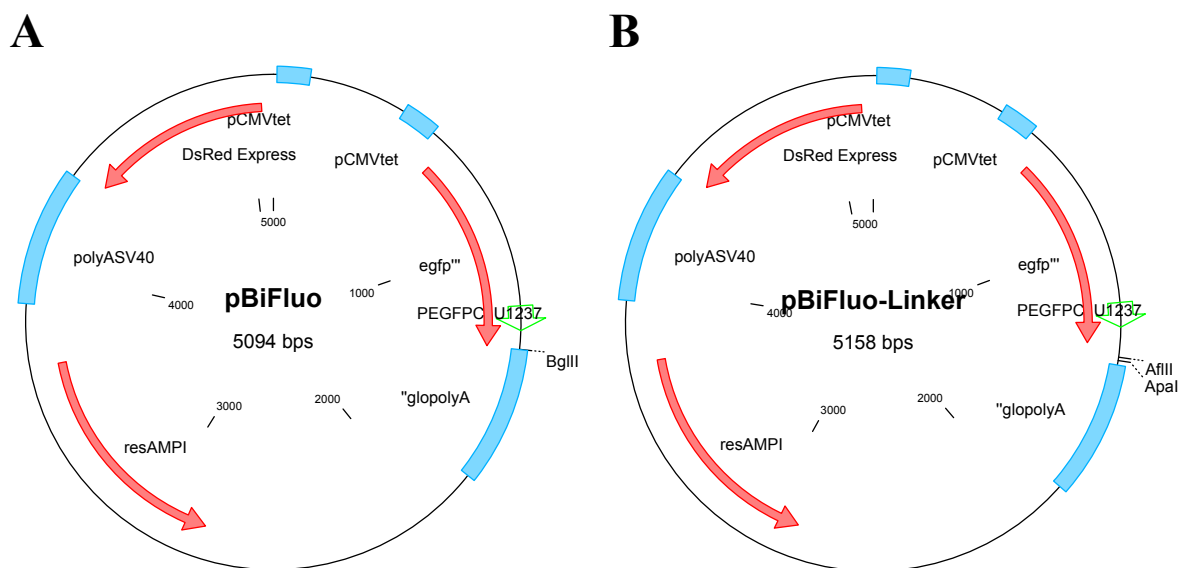


Figure M1, Carte de pBiFluo et pBiFluo-Linker. A) Carte de pBiFluo. Le site BglII pour l'insertion de linker est indiqué. **B) Carte de pBiFluo-Linker.** Les sites ApaI et AflII (introduits par le linker) pour l'insertion des séquences cibles des petit ARN régulateurs sont indiqués.

Des oligonucléotides ADN contenant les séquences cibles pour différents petits ARN régulateurs sont insérés sous forme de double brin dans les sites AflII-ApaI en aval de la région codante d'EGFP (Fig. M1B). Les deux extrémités étant différentes, l'orientation est prédéfinie par le sens d'insertion du linker à l'étape précédente. Dans ce travail je n'ai utilisé que les orientations sens, mais certaines constructions antisens ont été utilisées comme contrôle dans d'autres expériences.

MATERIELS ET METHODES

Les oligonucléotides utilisés sont listés dans le **Tableau 1**

Nom	Séquence (5' >> 3')	NT
3milet7 s	TTAAGGGACAGCCTATTGAACTACCTCACTCGGAGCACAGCCTATT GAACTACCTCAGGCCTGCACAGCCTATTGAACTACCTCAGGGCC	90
3milet7 as	CTGAGGTAGTTCAATAGGCTGTGCAGGCCTGAGGTAGTTCAATAGG CTGTGCTCCGAGTGAGGTAGTTCAATAGGCTGTCCC	82
2milet7 s	TTAAGGGACAGCCTATTGAACTACCTCACTCGGAGCACAGCCTATT GAACTACCTCAGGGCC	62
2milet7 as	CTGAGGTAGTTCAATAGGCTGTGCTCCGAGTGAGGTAGTTCAATAG GCTGTCCC	54
milet7 s	TTAAGGCACAGCCTATTGAACTACCTCAGGGCC	33
milet7 as	CTGAGGTAGTTCAATAGGCTGTGCC	25
silet7 s	TTAAGACTATACAACCTACTACCTCAGGGCC	31
silet7 as	CTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTC	23
3miCXCR4 s	TTAAGAAGTTTTACAAAGCTAACACCGGAAGTTTTACAAAGCTA ACACCGGAAGTTTTACAAAGCTAACACCGGGGGCC	82
3miCXCR4 as	CCCGGTGTTAGCTTTGTGAAAACCTCCGGTGTTAGCTTTGTGAAAA CTTCCGGTGTTAGCTTTGTGAAAACCTC	74
2miCXCR4 s	TTAAGAAGTTTTACAAAGCTAACACCGGAAGTTTTACAAAGCTA ACACCGGGGGCC	58
2miCXCR4 as	CCCGGTGTTAGCTTTGTGAAAACCTCCGGTGTTAGCTTTGTGAAAA CTTC	50
miCXCR4 s	TTAAGAAGTTTTACAAAGCTAACACCGGGGGCC	34
miCXCR4 as	CCCGGTGTTAGCTTTGTGAAAACCTC	26
siCXCR4 s	TTAAGAAGTTTTCACTCCAGCTAACACCGGGGGCC	35
siCXCR4 as	CCCGGTGTTAGCTGGAGTGAAAACCTC	27

Tableau 1, Oligonucléotides sens et antisens contenant les séquences cibles pour les petits ARN régulateurs. Les séquences de la série let-7 sont initialement définies par l'équipe de W. Filipowicz (Pillai et al. 2005) ; les séquences de la série CXCR4 sont initialement définies par l'équipe de P. Sharp (Doench et al. 2003).

Le promoteur bidirectionnel qui contrôle l'expression des plasmides de la série pBiFluo ainsi construits contient deux promoteurs pTRE identiques régulés par la tétracycline (ou la doxycycline). Chaque promoteur pTRE consiste en une séquence promotrice CMV minimal ($P_{\min}CMV$) et une séquence régulatrice TRE (Tet Response Element) en amont qui régule l'activité du premier (Fig. M2). La séquence TRE induit la transcription du gène contrôlé par le promoteur pTRE (dans notre cas EGFP ou DsRed) quand le transactivateur protéique y fixe. Dans les lignées cellulaires Tet-On, qui expriment consécutivement le transactivateur rtTA (Fig. M2), l'expression des plasmides pBiFluo et dérivés est induite par la doxycycline (DOX) car sa fixation sur rtTA permet à ce dernier d'interagir avec la séquence TRE, comme présenté dans la Figure M2.

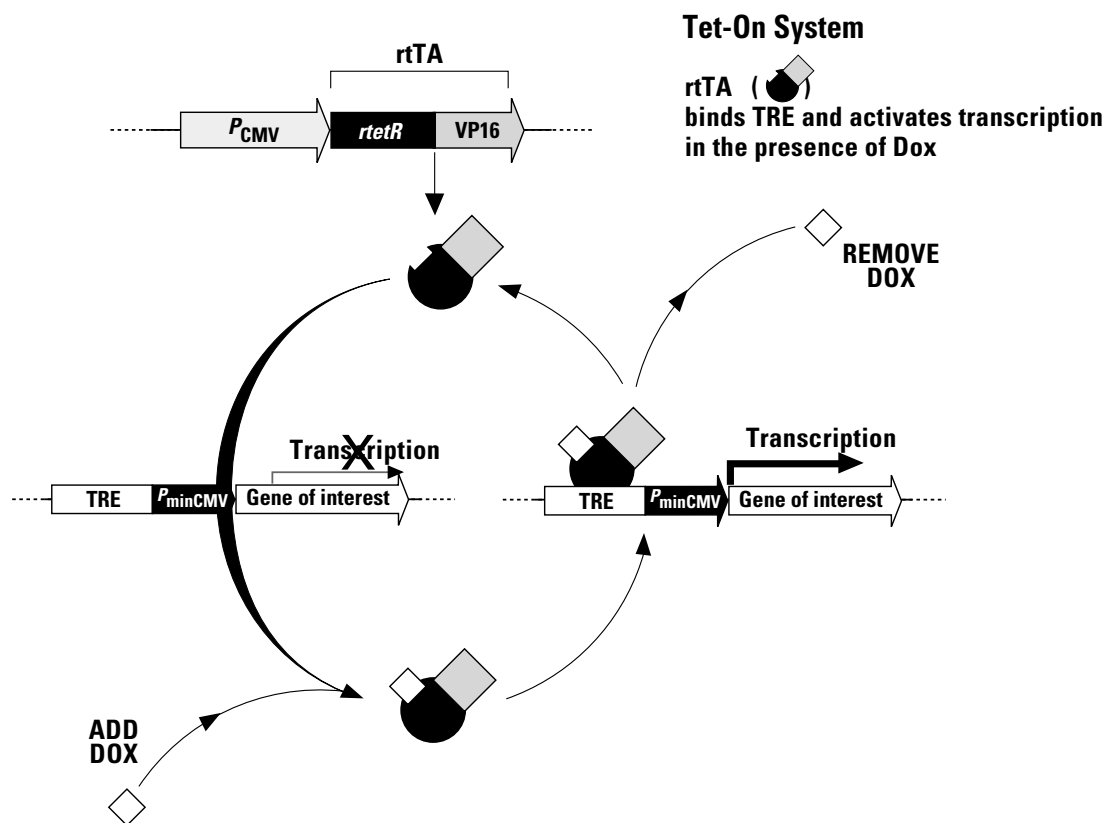


Figure M2, Schéma du système d'expression Tet-On.

b. Constructions indicatrices CMV et dérivés

En suivant le même protocole pour la construction des plasmides de la série pBiFluo, une série de constructions indicatrices fluorescentes conduites par le promoteur CMV ont été construites, le linker et les oligonucléotides assurant ces construction sont identique que ceux utilisés par les plasmides pBiFluo.

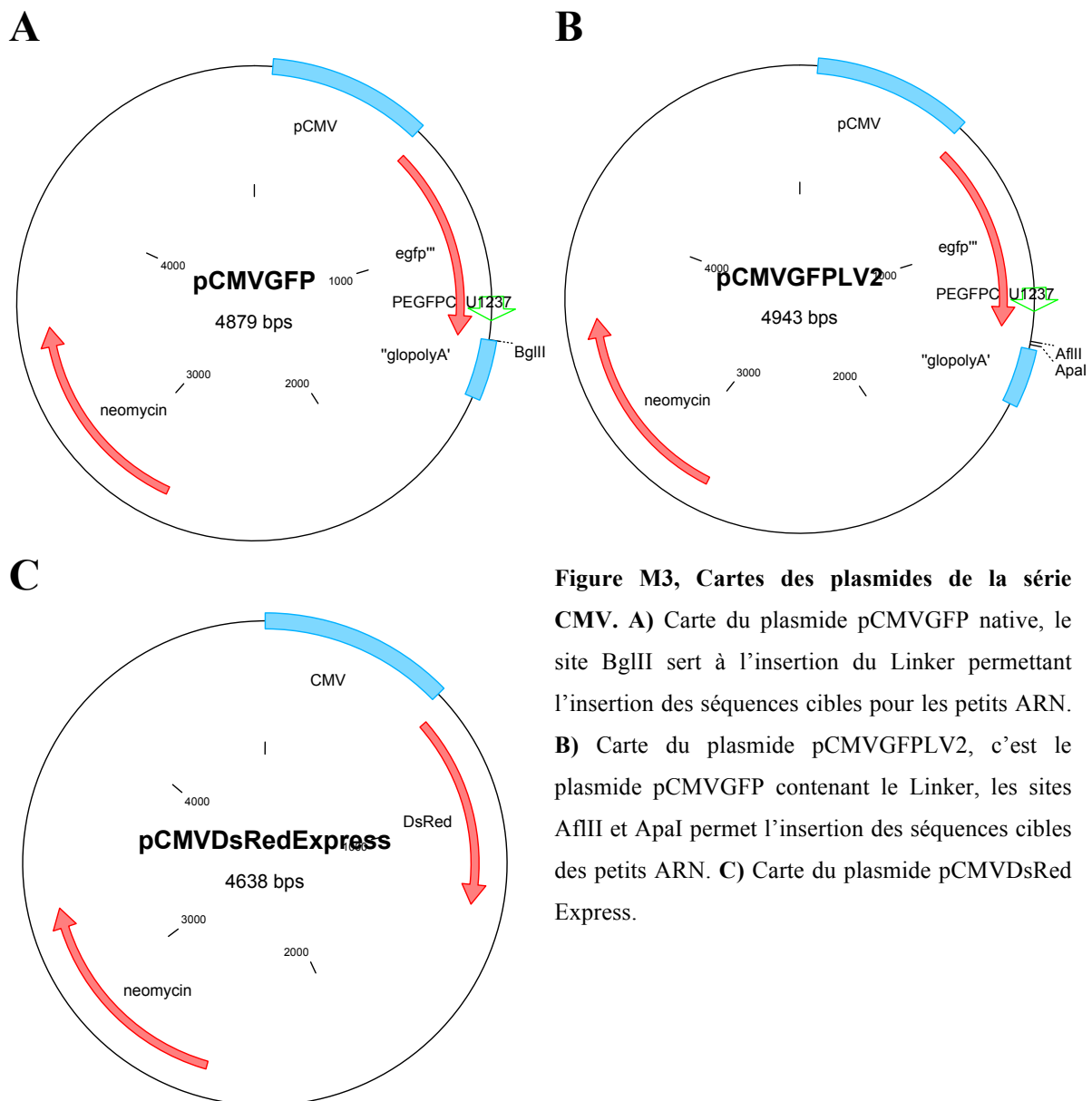


Figure M3, Cartes des plasmides de la série CMV. A) Carte du plasmide pCMVGFP native, le site BglII sert à l'insertion du Linker permettant l'insertion des séquences cibles pour les petits ARN. B) Carte du plasmide pCMVGFPPLV2, c'est le plasmide pCMVGFP contenant le Linker, les sites AflII et ApaI permet l'insertion des séquences cibles des petits ARN. C) Carte du plasmide pCMVDsRedExpress.

B. siARN

Les siARN sont synthétisés chimiquement par MWG Biotech ou Sigma Aldrich et fournis lyophilisés sous forme double brin. Les siARN sont mis en solution à une concentration finale de 100 μ M (solution stock) dans une solution contenant 100 mM de sel comme le siMAX 1X (MWG / Operon). Pour les transfections on utilise une solution à 10 μ M ou moins si nécessaire, afin de pouvoir mesurer la quantité nécessaire de manière précise ; typiquement l'ajout de 1 μ L de solution siARN à 10 μ M dans le mélange de transfection d'un puits d'une plaque de 12 (2 mL de milieu de culture) donne une concentration finale de 5 nM. La notion de concentration est utilisée ici par simplicité pour définir la quantité de siARN utilisée mais n'a pas de signification réelle puisque dans la plupart des techniques de transfection, les acides nucléiques sont sous forme d'agrégats et non d'une solution homogène.

siMax (MWG / Operon)

HEPES (pH 7.3)	30 mM
KCl	100 mM
MgCl ₂	1mM

siARN contrôle ou miARN

siContrôle				
Nom de siARN ou miARN	Espèce	Source de sélection	Nature de la cible	Séquence (de 5' à 3')
Ly1 (LTa2)	souris	Ambion	Exon4	GGUGGUUUUCUCUGGAGAA
Ly2	souris	Ambion	Exon4	GGGUUUUUGUGGGUCUAGG
LTi3	souris	Labo	Intron3	CCAUCCACUUGUCCAGUGUU
CD9	souris	Labo sisearch, specificity	messenger	UUCUCUUGCUCGAAGAUGC
miARN				
CXCR4	homme	Labo sisearch, specificity	CXCR4	UGUUAGCUGGAGUGAAAAC
siLet-7b	homme	Labo sisearch, specificity	Let-7	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGG

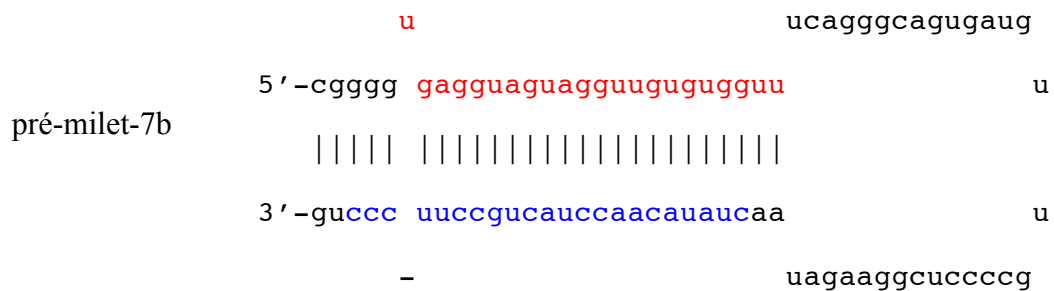
siARN contre Argonaute

Argonaute				
Gène cible	Nom de siARN ou miARN	Source de Sélection	Nature de la cible	Séquence (de 5' à 3')
Ago1	Ago1A	Labo sisearch	ARNm	GAAUGCCAGCUACAACUUA
Ago1	Ago1B	Li,L ;C.,Okino	ARNm	GAGAAGAGGUGCU

MATERIELS ET METHODES

		(2006)		CAAGAA
Ago1	Ago1D	Sigma 1	ARNm	CAACCUUGUUUCUG CAAAU
Ago2	Ago2A	Labo sisearch	ARNm	CGAAGUGCAAGUU UCAACA
Ago2	Ago2B	Li,L ;C.,Okino (2006)	ARNm	GCACGGAAGUCCA UCUGAA
Ago2	Ago2C	Aleman RNA 13, 385 (2007)	ARNm	GCAGGACAAAGAU GUAUUA
Ago2	Ago2D	Sigma1	ARNm	CUAUCAUUAUGAAU UGGAU
Ago3	Ago3A	Li,L ;C.,Okino (2006)	ARNm	GAAAUUAGCAGAUU GGUAA
Ago3	Ago3B4	Labo sisearch	ARNm	CGAUGUAUCAAGAA GCUAA
Ago3	Ago3SC	Santa Cruz biotechnolog y	ARNm	Mélange des trois séquences
Ago3	Ago3D	Sigma1	ARNm	CACACUUACGUACG CUGUA
Ago4	Ago4A	Li,L ;C.,Okino (2006)	ARNm	GGCCAGAACUAAUA GCAAU
Ago4	Ago4B	Labo sisearch	ARNm	GGA AUGUACAGUA GCUCAA
Ago4	Ago4D	Sigma1	ARNm	GGA AUGUACAGUA GCUCAA

Pré-milet-7b (Ambion), la partie correspond au brin guide est marquée en rouge.



Remarque : Pour les siARN qui ont été choisis dans le laboratoire, les logiciels utilisés sont indiqués ; pour ceux qui avaient été décrits dans la littérature, les auteurs sont indiqués.

C. Extraction d'ARN

a. Lyse au thiocyanate de guanidine et ultra-centrifugation

Cette technique a l'avantage de fournir des ARN intacts et avec une contamination très faible par l'ADN, ce qui est très utile pour les cellules transfectées. Par contre, la centrifugation sur coussin de césium conduit à la perte des molécules de petite taille et la présence éventuelle de traces de thiocyanate de guanidine peut gêner les réactions enzymatiques ultérieures.

Les cellules d'une boîte Φ 85 mm sont lysées avec 2 mL de solution de thiocyanate de guanidine 5,5 M. Ces lysats sont centrifugés sur un coussin de 1,5 mL de chlorure de césium 5,5 M dans un rotor Beckman de type SW55 pendant 16 heures à 40 000 tours/min à 20°C. Le culot est rincé une fois avec 1 mL d'éthanol 70% et repris dans 100 μ L de tampon TE contenant 0,2% SDS. Les ARN sont quantifiés par spectrophotométrie.

Solution de lyse :

Thiocyanate de guanidine	5,5 M
Citrate de sodium	5 mM (pH7)
2-mercaptoéthanol	100mM
Sarkosyl	0,5%

Coussin de césium :

Chlorure de césium	5,7 M
Acétate de sodium	25 mM (pH 5,5)

b. Extraction par kit SV total RNA isolation system (Promega)

Ce kit de purification sur colonne outil permet d'obtenir des ARN de bonne qualité qui sont de bons substrats pour les réactions enzymatiques, mais la capacité du kit est limitée et permet de traiter des boîtes de 60 mm mais pas de 85 mm de diamètre.

Les cellules d'une boîte de 60 mm sont lysées avec 800 μ L de solution dénaturante. 800 μ L d'isopropanol 100% sont ajoutés au lysat et, après agitation, le mélange est placé à – 20°C pendant minimum 30 min, puis centrifugé à 13000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est aspiré et le culot repris et fortement vortexé dans 175 μ L de tampon de lyse

« SV RNA lysis buffer ». La suite du protocole (cf. Promega©) utilise une purification par affinité sur une colonne de silice. Les ARN sont élués avec 100 µL d'eau et quantifiés par spectrophotométrie.

Solution dénaturante :

Thiocyanate de guanidine	4 M
Citrate de sodium	25 mM, pH7
2-β-mercaptoéthanol	100 mM
Sarkosyl	0,5%

D. Analyse d'ARN par RT-PCR quantitative

Les ARN extraits par le kit SV Total de Promega sont utilisés de préférence pour les analyses de RT-PCR quantitative. La réverse transcription est effectuée en utilisant la transcriptase inverse RevertAidTM H Minus M-MuLV (Fermentas) selon le protocole suivant :

- 1 µg d'ARN a été repris dans de l'eau distillé pour un volume final de 12 µL
- 1 µL d'amorces hexamériques aléatoires à 0,2 µg/µL sont ajoutées ou, dans le cas d'une reverse transcription, à partir de la queue poly(A) d'amorce dT₁₈ à 0,5 µg/µL (Fermentas).
- Les tubes sont incubés à 65°C pendant 5 minutes puis mis dans la glace 1 minute.
- Dans chaque tube 4µL du tampon 5 x de transcription a été rajouté, 2 µL de dNTP (10 mM), 1 µL de transcriptase inverse (200 U/µL), le mélange est incubé à 42°C, une heure.

Les PCR en temps réel ont été effectuées dans un appareil Light Cycler (Roche) dans un volume final de 10 µL en utilisant le Syber green comme agent intercalant. Les réactifs utilisés sont ceux du « kit Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix (2X) » (Fermentas). Le « master mix » contient la Maxima® Hot Start *Taq* DNA polymérase, le SYBR® Green I et les dNTPs dans un tampon PCR optimisé. Selon le protocole de Fermentas, on distribue 8 µL/capillaire du mélange commun auquel on ajoute 2 µL de l'ADNc (produit de transcription inverse non dilué) dans le capillaire. Les capillaires sont centrifugés à 1500 tours/min pendant 1 minute.

Le protocole standard de réverse transcription est :

MATERIELS ET METHODES

- pré-incubation à 95°C, 4 minutes
- 45 cycles d'amplification : 95°C, 15 sec, 60°C, 20 sec, 72°C, 30 sec.
- Courbe de fusion après le dernier cycle.

L'analyse des données est faite en utilisant la dérivée seconde de la fluorescence pour définir le cycle auquel émerge le signal (cycle du seuil « C_t »).

Mélange de PCR (par capillaire)

Mix 2X	5 µL
Amorce sens ou antisens	3 µM (0,3µL à partir des amorces à 10 µM)
H ₂ O qsp	8 µL/capillaire

Amorces RT-PCR

Nom	Séquence (5' >> 3')
EGFP 769-897 as	GGACTTGAAGAAGTCGTGCT
EGFP 769-897 s	CTGAAGTTCATCTGCACCAC
GAPDH as	TTGTCATACCAGGAAATGAGC
GAPDH s	GTCTCCTCTGACTTCAACAG

Ces amorces sont définies par Primer3 (v.0.4.0, <http://frodo.wi.mit.edu>)

ANNEXES

Vérification et optimisations des conditions expérimentales

Profil d'expression des constructions de la série pBiFluo dans les cellules U2OS Tet-On

La Figure S1 présente le profil d'expression des constructions indicatrices de la série pBiFluo dans les cellules U2OS Tet-On sous forme de nuage de points pour différentes conditions expérimentales. Le niveau d'autofluorescence des cellules U2OS Tet-On est illustré dans la Figure S1A où elles sont transfectées transitoirement par un plasmide vide qui n'exprime aucune protéine fluorescente. A ce réglage qui focalise sur les cellules exprimant à haut niveau les gènes rapporteurs, l'autofluorescence n'est pas visible dans le dot-plot. Quand les cellules sont transfectées par un plasmide pBiFluo ou dérivé, les cellules non induites expriment les 2 protéines fluorescentes à un niveau assez faible (Fig. S1B), le niveau d'expression de ces gènes rapporteurs est fortement stimulé en présence d'1 $\mu\text{g/ml}$ de doxycycline, ceci est reflété non seulement par les valeurs plus importantes des deux fluorescences, mais aussi par le nombre bien plus important de points visibles dans le nuage de points comme montré dans la Figure S1C.

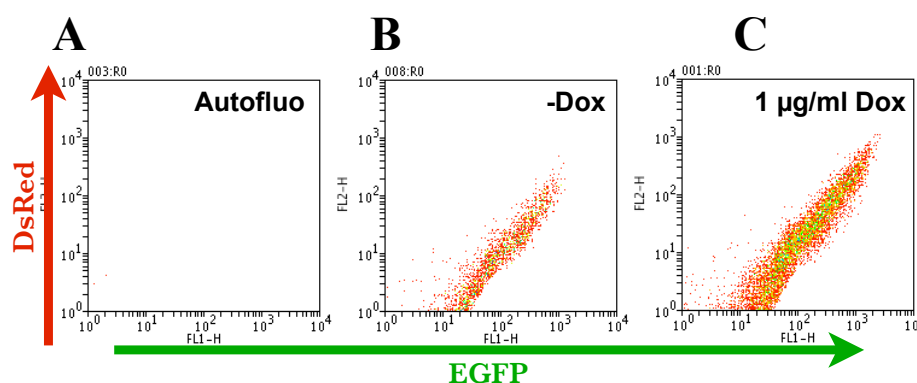


Figure S1, Expression des constructions indicatrices pBiFluo par transfection transitoire dans les cellules U2OS Tet-On. Les dot-plots indiquent l'intensité d'EGFP (axe X) et de DsRed (axe Y) dans chaque cellule. **A)** Nuage de points pour un échantillon transfecté par le plasmide contrôle. **B)** Nuage de points pour un échantillon transfecté par le plasmide pBiFluo, l'expression des gènes rapporteurs n'étant pas induite. **C)** Nuage de points pour un échantillon transfecté par le plasmide pBiFluo, l'expression des gènes rapporteurs étant induite par 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxycycline, 32 h avant l'analyse.

Détermination de la dose saturante des petits ARN régulateurs dans d'autres lignées cellulaires

Afin d'éviter les ambiguïtés, l'identification des cellules résistantes au silencing en mode miARN est faite seulement quand la régulation est au niveau maximal, il est donc nécessaire de déterminer la dose saturante des petits ARN régulateurs pour la mise en place d'un tel silencing post-transcriptionnel dans la lignée cellulaire étudiée.

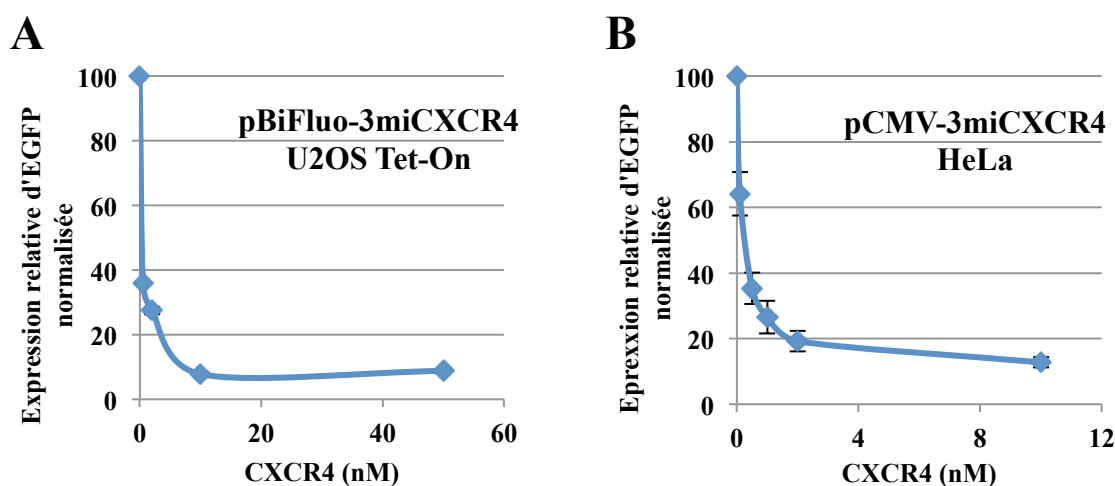


Figure S2, Les courbes de dose-réponse en mode miARN dans les cellules U2OS Tet-On et HeLa.

A) Dose réponse dans les cellules U2OS Tet-On. Le plasmide rapporteur pBiFluo-3miCXCR4 portant 3 séquences cibles partiellement complémentaires avec le petit ARN régulateur siCXCR4 en aval de la région codante de l'EGFP est co-transfecté avec différentes quantités de siCXCR4 dans les cellules U2OS Tet-On d'une manière transitoire. L'expression des deux protéines fluorescentes est induite 32 h avant l'analyse par la cytométrie en flux. **B) Dose réponse dans les cellules HeLa.** Le plasmide rapporteur « vert » pCMV-3miCXCR4 portant 3 séquences cibles partiellement complémentaires avec siCXCR4 en aval de la région codante de l'EGFP est co-transfecté de manière transitoire avec le plasmide rapporteur « rouge » pCMVDsRed et différentes quantités de siCXCR4 dans les cellules HeLa. L'analyse par la cytométrie a lieu 48 h après la transfection. Le niveau de la régulation induit par le petit ARN dans ces deux lignées est calculé de la même manière que dans la **Figure 18**.

La Figure S2 montre les doses réponses du petit ARN régulateur siCXCR4 dans les cellules U2OS Tet-On et les cellules HeLa. La Figure S2A montre que l'inhibition maximale de l'expression d'EGFP (exprimée par pBiFluo-3miCXCR4) par le petit ARN régulateur siCXCR4 est de l'ordre de 90 %, elle n'est atteinte qu'en présence d'environ 10 nM de siCXCR4 et n'augmente plus au-delà. La dose saturante de siCXCR4 chez les cellules U2OS Tet-On est donc de l'ordre de 10 nM. Pour cette raison, j'ai utilisé cette dose pour les expériences discutées dans la **Figure 31** effectuées dans cette lignée. D'après

le même raisonnement, j'ai utilisé 2 nM de siCXCR4 pour établir un silencing maximal en mode miARN dans les cellules HeLa pour les expériences de la **Figure 32**, parce que la courbe de dose réponse dans cette lignée (Fig. S2B) indique que le silencing sur l'EGFP (exprimée par le plasmide pCMV-3miCXCR4) atteint son plateau avec 2 nM de siCXCR4 transfecté.

De même, la dose saturante de siCXCR4 pour le silencing en mode miARN dans le clone stable HEK293 Tet-On 2miCXCR4-CL6 a été déterminée par une dose réponse montrée dans la Figure S3. La dose saturante de siCXCR4 chez ce clone stable ainsi déterminée est de 2 nM. Cette dose a été utilisée dans les expériences discutées dans les **Figures 34, 35 et 36**.

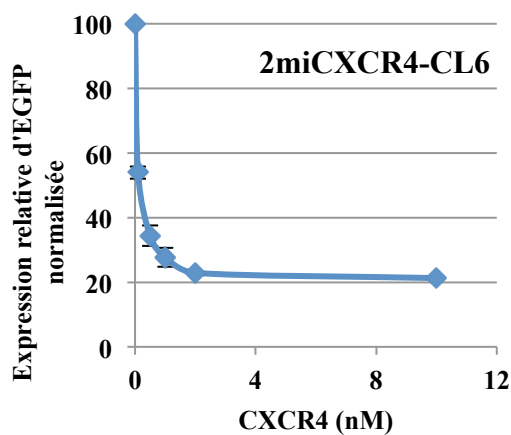


Figure S3, Dose-réponse en mode miARN dans le clone stable HEK293 Tet-On 2miCXCR4-CL6. Différentes quantités de siCXCR4 sont transfectées dans les cellules 2miCXCR4-CL6 avec un plasmide entraîneur. L'expression des transgènes est induite 32 h avant l'analyse par la cytométrie en flux. Le niveau du silencing induit par siCXCR4 est calculé de la même manière que dans la **Figure 18**.

Données supplémentaires

Homogénéité de la transfection des petits ARN régulateurs

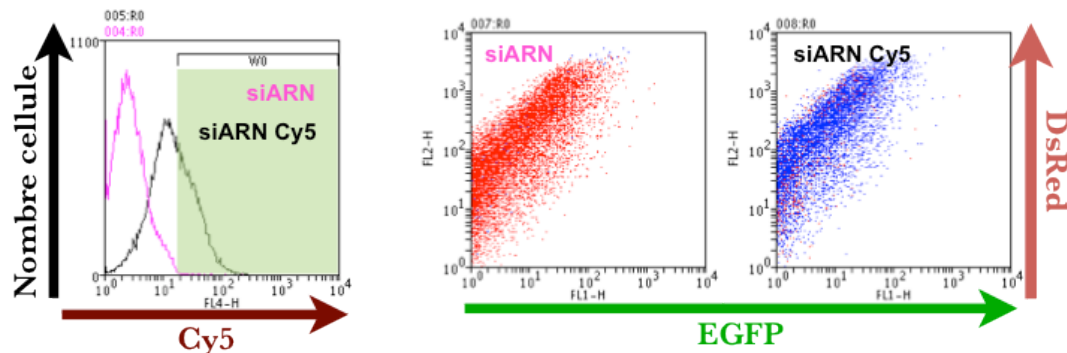


Figure S4, La transfection des petits ARN est homogène (cas de pBiFluo-silet7, silencing en mode siARN). Les cellules HEK293 Tet-On sont transfectées par le plasmide pBiFluo-silet7 avec 10 nM du petit ARN silet-7b ou la même dose du petit ARN marqué silet-7b-Cy5, l'expression des deux protéines fluorescentes et la fluorescence de Cy5 sont mesurées par cytométrie en flux 32 h après l'induction du plasmide (détection sur trois canaux : FL1, FL2, FL4). La courbe noire dans l'histogramme à gauche montre la fluorescence dans le canal FL4 des cellules transfectées avec silet-7b-Cy5, la courbe rose montre celle d'une transfection silet-7b non marqué. La sélection par la région verte élimine l'autofluorescence des cellules en FL4-H. Le dot-plot « siARN Cy5 » montre le profil de la régulation en mode miARN induite par silet-7b-Cy5, le dot-plot « siARN » montre celui de la régulation induite par silet-7b non marqué. Les points dont l'intensité Cy5 est supérieure à l'autofluorescence sont en bleu, les autres points sont en rouge. Les nuages de points illustrent le niveau d'EGFP (axe X) et de DsRed (axe Y) des cellules analysées. 3 expériences indépendantes ont été réalisées et la figure montre un jeu de données représentatif.

La Figure S4 montre un exemple représentatif des expériences effectuées afin d'évaluer l'efficacité de la transfection des petit ARN dans le cas du silencing en mode siARN, ils s'agit des expériences parallèles à celles discutées dans la **Figure 28** pour le mode imparfait. L'histogramme à gauche montre la fluorescence dans le canal FL4 correspondant à la détection du fluorochrome Cy5. Nous constatons que la distribution des points bleus est homogène parmi l'ensemble des cellules analysées, les quelques cellules négatives (rouges) se répartissant à travers l'ensemble du nuage de point. Ainsi, comme pour le mode miARN, la transfection des petits ARN régulateurs est homogène parmi dans les cellules HKE293 Tet-On.

L'augmentation de la dose de petit ARN régulateur ne fait pas disparaître les cellules résistantes au silencing en mode miARN

Comme montré dans la **Figure 32**, les cellules HeLa résistantes au silencing en mode miARN expriment très fortement le gène cible EGFP. Ceci pourrait refléter une saturation de la régulation. Pour essayer de répondre directement à cette question, j'ai utilisé des doses plus fortes de petit ARN régulateur. La Figure S5 montre les nuages de points correspondant à un silencing par 2 nM ou 50 nM de siCXCR4. On peut observer que la proportion des cellules résistantes au silencing de pCMV-3miCXCR4 par le petit ARN siCXCR4 n'est quasiment pas diminuée même avec 25 fois plus de siCXCR4 transfecté. Cette observation est en accord avec la conclusion de la **Figure 32**, et suggère que la population résistante de cellules HeLa diffère de manière intrinsèque de celle des cellules compétentes.

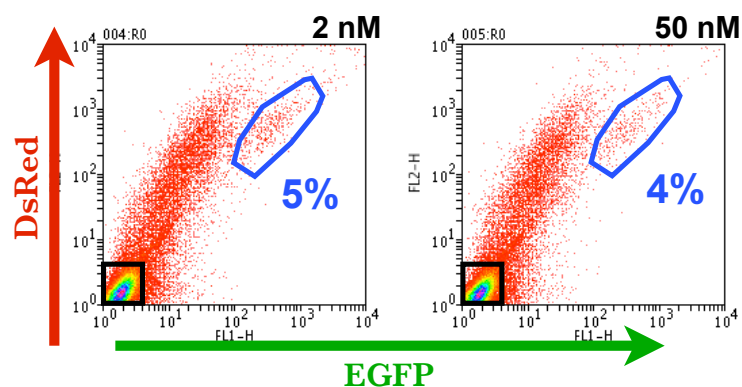


Figure S5, Résistance au silencing en mode miARN dans les cellules HeLa. Les cellules HeLa sont transfectées par pCMV-DsRed/pCMV-3miCXCR4 avec 2 nM ou 50 nM de petit ARN régulateur siCXCR4. L'analyse par la cytométrie en flux a lieu 48 h après la transfection. Le polygone bleu détermine les cellules résistantes au silencing d'après les principes discutés dans la **Figure 32**. Le pourcentage indiqué est déterminé par rapport aux cellules positives (en excluant les cellules autofluorescentes entourées par le rectangle noir). Les nuages de points illustrent le niveau d'EGFP (axe X) et de DsRed (axe Y) des cellules analysées. Trois expériences indépendantes ont été réalisées et la figure montre un jeu de données représentatif.

Une limitation de ce type d'expérience est que l'on ne peut assurer un silencing moyen plus efficace simplement en augmentant la dose de petit ARN, comme montré dans les expériences de dose-réponse. L'interprétation de ces expériences est donc plutôt que si la transfection des petits ARN n'est pas parfaitement homogène, l'augmentation de la dose transfectée devrait permettre de diminuer le nombre de cellules recevant une faible dose. L'absence de réponse est donc en accord avec les résultats obtenus par marquage du petit

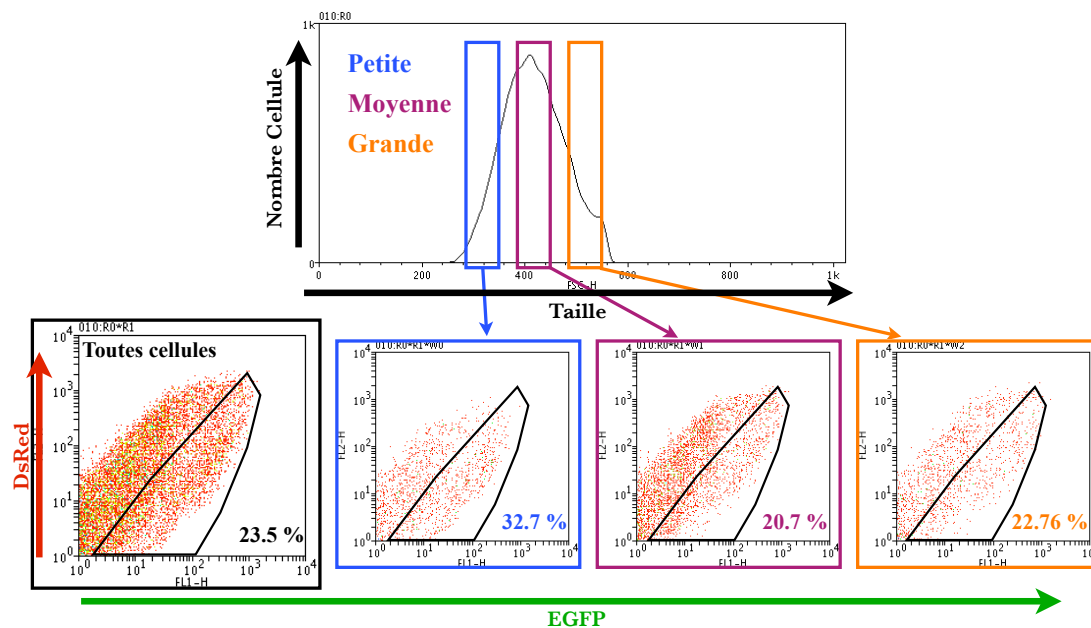
ARN (Figure 28) qui n'indique pas de population faiblement transfectée. Il faut noter que les deux diagrammes montrés dans la Figure S4 proviennent d'une autre série d'expériences que ceux montrés dans la **Figure 32**. En effet, l'efficacité de transfection varie entre les cultures cellulaires, et les données ne peuvent être précisément comparées qu'à l'intérieur d'une série de transfections.

Les cellules résistantes à la régulation en mode miARN sont plus fréquentes parmi les cellules de petite taille

Une étude de la relation entre la taille des cellules et la régulation en mode miARN a été réalisée pour la construction indicatrice pBiFluo-3milet7 et le petit ARN silet-7b comme celle montrée dans la **Figure 37** pour siCXCR4. Au sein d'une acquisition des données, les cellules de différentes tailles sont sélectionnées en fonction de leur valeur FSC-H comme montré dans la Figure S6A par les rectangles de différentes couleurs. La proportion des cellules résistantes sur les cellules positives (DsRed > 1) dans chacune des sous-populations est ensuite calculée de la même manière que dans la **Figure 37**. Les résultats de 6 expériences indépendantes sont résumés dans la Figure S6B.

Chez la population de petite taille, la proportion des cellules résistantes au silencing en mode miARN est plus importante et représente environ 35 % des cellules positives, au lieu de 25 % dans la population de départ. Cette différence est significative d'après un *t-test* ($n = 6$, ** : $p < 0.01$). Une proportion plus faible de cellules résistantes est observée dans les cellules de taille moyenne ($n = 6$, * : $p < 0.05$). Ces expériences confirment la conclusion de la **Figure 37** pour une autre construction indicatrice et un autre petit ARN régulateur : les cellules résistantes sont enrichies parmi les cellules de petite taille.

A



B

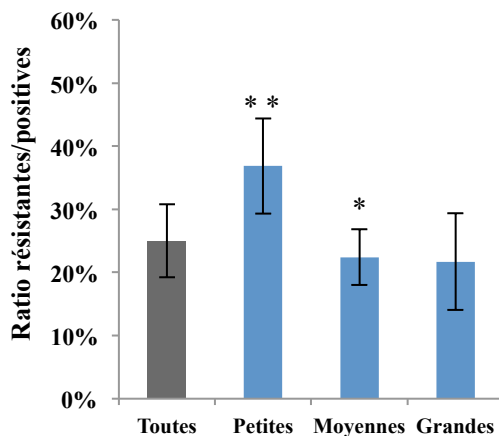


Figure S6, Les cellules résistantes au silencing en mode miARN sont plus fréquentes parmi les cellules de petite taille (cas de pBiFluo-3milet7).

Les données utilisées pour cette analyse ont été obtenues par transfection transitoire de pBiFluo-3milet7 et 2 nM de petit ARN régulateur silet-7b dans les cellules HEK293 Tet-On. L'induction de l'expression des gènes rapporteurs a lieu 32 h avant l'analyse par la cytométrie. **A)** Schéma représentatif des analyses évaluant le ratio des cellules résistantes

parmi les cellules positives en fonction de leur taille. L'histogramme montre la distribution des cellules en fonction de leur valeur FSC-H (qui reflète en partie la taille d'une cellule). Les trois rectangles de différentes couleurs délimitent les cellules de différentes tailles, le bleu pour les petites cellules, le violet pour les cellules moyennes et l'orange pour les plus grandes cellules. Les nuages de points correspondant à ces différentes populations, ainsi qu'à l'ensemble des cellules sont présentés. Le polygone noir détermine les cellules résistantes (cette détermination a été discutée dans la **Figure 27C**). Le pourcentage des cellules entourées par le polygone parmi les cellules positives de la sous-population sélectionnée est indiqué. **B)** L'histogramme résume la proportion des cellules résistantes au silencing en mode miARN parmi les cellules positives de la population étudiée. La colonne gris foncé montre cette proportion dans toutes les cellules figurées dans l'histogramme de la **Figure A**. Les 3 colonnes bleues montrent cette proportion dans différentes sous-populations délimitées par les rectangles de la **Figure A** comme indiqués. La différence entre cette proportion de chaque sous-population (bloc bleu) et celle de la totalité des cellules (bloc gris foncé) est validée par un *t-test* ($n = 6, p < 0,01 : ** ; p < 0.05 : *$).

BIBLIOGRAPHIE

- Altuvia, Y. et al., 2005. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic acids research*, 33(8), pp.2697–2706.
- Alvarez-Saavedra, E. & Horvitz, H.R., 2010. Many families of *C. elegans* microRNAs are not essential for development or viability. *Current biology : CB*, 20(4), pp.367–373.
- Ameres, S.L. et al., 2010. Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science (New York, NY)*, 328(5985), pp.1534–1539.
- Aravin, A.A. et al., 2008. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Molecular cell*, 31(6), pp.785–799.
- Aravin, A.A. et al., 2003. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Developmental cell*, 5(2), pp.337–350.
- Aravin, A.A., Hannon, G.J. & Brennecke, J., 2007a. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science (New York, NY)*, 318(5851), pp.761–764.
- Aravin, A.A., Sachidanandam, R., et al., 2007b. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science (New York, NY)*, 316(5825), pp.744–747.
- Aravind, L. et al., 2000. Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21), pp.11319–11324.
- Baccarini, A. et al., 2011. Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells. *Current biology : CB*, 21(5), pp.369–376.
- Baek, D. et al., 2008. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455(7209), pp.64–71.
- Bagga, S. et al., 2005. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*, 122(4), pp.553–563.
- Bail, S. et al., 2010. Differential regulation of microRNA stability. *RNA (New York, NY)*, 16(5), pp.1032–1039.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), pp.281–297.
- Behm-Ansmant, I. et al., 2006. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & development*, 20(14), pp.1885–1898.

BIBLIOGRAPHIE

- Beilharz, T.H. et al., 2009. microRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells. *PloS one*, 4(8), p.e6783.
- Berezikov, E. et al., 2007. Mammalian mirtron genes. *Molecular cell*, 28(2), pp.328–336.
- Béthune, J., Artus-Revel, C.G. & Filipowicz, W., 2012. Kinetic analysis reveals successive steps leading to miRNA-mediated silencing in mammalian cells. *EMBO Reports*, 13(8), pp.716–723.
- Bhattacharyya, S.N. et al., 2006. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*, 125(6), pp.1111–1124.
- Birmingham, A. et al., 2006. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nature methods*, 3(3), pp.199–204.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. & Gorlich, D., 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA (New York, NY)*, 10(2), pp.185–191.
- Borchert, G.M., Lanier, W. & Davidson, B.L., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*, 13(12), pp.1097–1101.
- Braun, J.E. et al., 2011. GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Molecular cell*, 44(1), pp.120–133.
- Brennecke, J. et al., 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, 128(6), pp.1089–1103.
- Brennecke, J. et al., 2005. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS biology*, 3(3), p.e85.
- Broderick, J.A. et al., 2011. Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing. *RNA (New York, NY)*, 17(10), pp.1858–1869.
- Brodersen, P. & Voinnet, O., 2009. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(2), pp.141–148.
- Brodersen, P. et al., 2008. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science (New York, NY)*, 320(5880), pp.1185–1190.
- Brown, K.M., Chu, C.-Y. & Rana, T.M., 2005. Target accessibility dictates the potency of human RISC. *Nature structural & molecular biology*, 12(5), pp.469–470.
- Buchan, J.R. & Parker, R., 2009. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Molecular cell*, 36(6), pp.932–941.
- Cai, X., Hagedorn, C.H. & Cullen, B.R., 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA (New York, NY)*, 10(12), pp.1957–1966.

BIBLIOGRAPHIE

- Carmell, M.A. & Hannon, G.J., 2004. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nature structural & molecular biology*, 11(3), pp.214–218.
- Carthew, R.W. & Sontheimer, E.J., 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), pp.642–655.
- Castilla-Llorente, V. et al., 2012. Mammalian GW220/TNGW1 is essential for the formation of GW/P bodies containing miRISC. *The Journal of cell biology*, 198(4), pp.529–544.
- Cerutti, L., Mian, N. & Bateman, A., 2000. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends in biochemical sciences*, 25(10), pp.481–482.
- Cesana, M. et al., 2011. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell*, 147(2), pp.358–369.
- Chang, J. et al., 2004. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA biology*, 1(2), pp.106–113.
- Chatterjee, S. & Großhans, H., 2009. Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 461(7263), pp.546–549.
- Chatterjee, S. et al., 2011. Target-mediated protection of endogenous microRNAs in *C. elegans*. *Developmental cell*, 20(3), pp.388–396.
- Chekulaeva, M. et al., 2011. miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs. *Nature Publishing Group*, 18(11), pp.1218–1226.
- Cheloufi, S. et al., 2010. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, 465(7298), pp.584–589.
- Chen, C. et al., 2009. Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nature structural & molecular biology*.
- Chen, C.-Z. et al., 2004. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science (New York, NY)*, 303(5654), pp.83–86.
- Chen, L.-L. & Carmichael, G.G., 2009. Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA. *Molecular cell*, 35(4), pp.467–478.
- Chung, W.-J. et al., 2008. Endogenous RNA interference provides a somatic defense against *Drosophila* transposons. *Current biology : CB*, 18(11), pp.795–802.
- Cifuentes, D. et al., 2010. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science (New York, NY)*, 328(5986), pp.1694–1698.
- Czech, B. & Hannon, G.J., 2011. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes.

BIBLIOGRAPHIE

- Nature reviews Genetics*, 12(1), pp.19–31.
- Czech, B. et al., 2008. An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature*, 453(7196), pp.798–802.
- Czech, B. et al., 2009. Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. *Molecular cell*, 36(3), pp.445–456.
- Denli, A.M. et al., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), pp.231–235.
- Derry, M.C. et al., 2006. Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 71, pp.537–543.
- Detzer, A. et al., 2011. Cell stress is related to re-localization of Argonaute 2 and to decreased RNA interference in human cells. *Nucleic acids research*, 39(7), pp.2727–2741.
- Didiano, D. & Hobert, O., 2006. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nature structural & molecular biology*, 13(9), pp.849–851.
- Diederichs, S. & Haber, D.A., 2007. Dual Role for Argonautes in MicroRNA Processing and Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Expression. *Cell*, 131(6), pp.1097–1108.
- Ding, L. & Han, M., 2007. GW182 family proteins are crucial for microRNA-mediated gene silencing. *Trends in cell biology*, 17(8), pp.411–416.
- Ding, L. et al., 2005. The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*. *Molecular cell*, 19(4), pp.437–447.
- Djuranovic, S., Nahvi, A. & Green, R., 2012. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science (New York, NY)*, 336(6078), pp.237–240.
- Doench, J.G. & Sharp, P.A., 2004. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & development*, 18(5), pp.504–511.
- Doench, J.G., Petersen, C.P. & Sharp, P.A., 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes & development*, 17(4), pp.438–442.
- Drinnenberg, I.A. et al., 2009. RNAi in budding yeast. *Science (New York, NY)*, 326(5952), pp.544–550.
- Ebert, M.S. & Sharp, P.A., 2010. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA (New York, NY)*, 16(11), pp.2043–2050.
- Ebert, M.S., Neilson, J.R. & Sharp, P.A., 2007. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nature methods*, 4(9), pp.721–726.

BIBLIOGRAPHIE

- El-Shami, M. et al., 2007. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes & development*, 21(20), pp.2539–2544.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., et al., 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836), pp.494–498.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., et al., 2001b. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *The EMBO journal*, 20(23), pp.6877–6888.
- Elkayam, E. et al., 2012. The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a. *Cell*.
- Ender, C. & Meister, G., 2010. Argonaute proteins at a glance. *Journal of cell science*, 123(Pt 11), pp.1819–1823.
- Engels, B. et al., 2012. Polypyrimidine tract binding protein (hnRNP I) is possibly a conserved modulator of miRNA-mediated gene regulation. *PloS one*, 7(3), p.e33144.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I. & Izaurralde, E., 2007a. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(1), pp.9–22.
- Eulalio, A., Helms, S., et al., 2009a. A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. *RNA (New York, NY)*, 15(6), pp.1067–1077.
- Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E., 2008a. Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell*, 132(1), pp.9–14.
- Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E., 2008b. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nature structural & molecular biology*, 15(4), pp.346–353.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., et al., 2009b. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA (New York, NY)*, 15(1), pp.21–32.
- Eulalio, A., Rehwinkel, J., et al., 2007b. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes & development*, 21(20), pp.2558–2570.
- Eulalio, A., Tritschler, F. & Izaurralde, E., 2009c. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA (New York, NY)*, 15(8), pp.1433–1442.
- Eulalio, A., Tritschler, F., Büttner, R., et al., 2009d. The RRM domain in GW182 proteins contributes to miRNA-mediated gene silencing. *Nucleic acids research*, 37(9), pp.2974–2983.
- Eystathiou, T. et al., 2002. A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Molecular biology of the cell*, 13(4), pp.1338–1351.

BIBLIOGRAPHIE

- Fabian, M.R. et al., 2009. Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Molecular cell*, 35(6), pp.868–880.
- Fabian, M.R. et al., 2011. miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nature Publishing Group*, 18(11), pp.1211–1217.
- Faller, M. et al., 2007. Heme is involved in microRNA processing. *Nature structural & molecular biology*, 14(1), pp.23–29.
- Filipowicz, W. et al., 2005. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current opinion in structural biology*, 15(3), pp.331–341.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. & Sonenberg, N., 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews Genetics*, 9(2), pp.102–114.
- Fire, A. et al., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), pp.806–811.
- Förstemann, K. et al., 2007. *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. *Cell*, 130(2), pp.287–297.
- Franco-Zorrilla, J.M. et al., 2007. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics*, 39(8), pp.1033–1037.
- Frank, F. et al., 2011. Structural analysis of 5'-mRNA-cap interactions with the human AGO2 MID domain. *EMBO Reports*, 12(5), pp.415–420.
- Frank, F., Sonenberg, N. & Nagar, B., 2010. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature*.
- Fukuda, T. et al., 2007. DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nature Cell Biology*, 9(5), pp.604–611.
- Gagnon, K.T. & Corey, D.R., 2012. Argonaute and the nuclear RNAs: new pathways for RNA-mediated control of gene expression. *Nucleic acid therapeutics*, 22(1), pp.3–16.
- Gaur, A. et al., 2007. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer research*, 67(6), pp.2456–2468.
- Ghildiyal, M. & Zamore, P.D., 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature reviews Genetics*, 10(2), pp.94–108.
- Ghildiyal, M. et al., 2008. Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science (New York, NY)*, 320(5879), pp.1077–1081.
- Ghildiyal, M. et al., 2010. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway. *RNA (New York, NY)*, 16(1), pp.43–56.

BIBLIOGRAPHIE

- Gibbings, D. et al., 2012. Human prion protein binds Argonaute and promotes accumulation of microRNA effector complexes. *Nature Publishing Group*.
- Gibbings, D.J. et al., 2009. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature Cell Biology*, 11(9), pp.1143–1149.
- Giraldez, A.J. et al., 2006. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science (New York, NY)*, 312(5770), pp.75–79.
- Gregory, R.I. et al., 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4), pp.631–640.
- Gregory, R.I. et al., 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014), pp.235–240.
- Grimson, A. et al., 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell*, 27(1), pp.91–105.
- Guil, S. & Cáceres, J.F., 2007. The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nature structural & molecular biology*, 14(7), pp.591–596.
- Guo, H. et al., 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308), pp.835–840.
- Haley, B. & Zamore, P.D., 2004. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nature structural & molecular biology*, 11(7), pp.599–606.
- Haley, B., Tang, G. & Zamore, P.D., 2003. In vitro analysis of RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Methods (San Diego, Calif)*, 30(4), pp.330–336.
- Han, J. et al., 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125(5), pp.887–901.
- Han, J. et al., 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development*, 18(24), pp.3016–3027.
- Havens, M.A. et al., 2012. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic acids research*.
- He, L. et al., 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435(7043), pp.828–833.
- Hendrickson, D.G. et al., 2009. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS biology*, 7(11), p.e1000238.
- Houseley, J., LaCava, J. & Tollervey, D., 2006. RNA-quality control by the exosome. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(7), pp.529–539.
- Höck, J. et al., 2007. Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-

BIBLIOGRAPHIE

- protein complexes in human cells. *EMBO Rep*, 8(11), pp.1052–1060.
- Hu, H.Y. et al., 2009. Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics*, 10, p.413.
- Huang, L. et al., 2011. Mitochondria associate with P-bodies and modulate miRNA-mediated RNA interference. *The Journal of biological chemistry*.
- Humphreys, D.T. et al., 2005. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), pp.16961–16966.
- Huntzinger, E. & Izaurralde, E., 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature reviews Genetics*, 12(2), pp.99–110.
- Hutvagner, G. & Zamore, P.D., 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science (New York, NY)*, 297(5589), pp.2056–2060.
- Hwang, H.-W., Wentzel, E.A. & Mendell, J.T., 2009. Cell-cell contact globally activates microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(17), pp.7016–7021.
- Ivashuta, S. et al., 2011. Regulation of gene expression in plants through miRNA inactivation. *PloS one*, 6(6), p.e21330.
- Iwasaki, S., Kawamata, T. & Tomari, Y., 2009. Drosophila Argonaute1 and Argonaute2 Employ Distinct Mechanisms for Translational Repression. *Molecular cell*.
- Jackson, A.L. et al., 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology*, 21(6), pp.635–637.
- Jackson, A.L. et al., 2006. Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA (New York, NY)*, 12(7), pp.1179–1187.
- Jackson, R.J. & Standart, N., 2007. How do microRNAs regulate gene expression? *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2007(367), p.re1.
- Jakymiw, A. et al., 2005. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nature Cell Biology*, 7(12), pp.1267–1274.
- Janowski, B.A. et al., 2006. Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nature structural & molecular biology*, 13(9), pp.787–792.
- Jin, H. et al., 2009. Human UPF1 participates in small RNA-induced mRNA downregulation. *Molecular and cellular biology*, 29(21), pp.5789–5799.
- Jinek, M. et al., 2010. Structural insights into the human GW182-PABC interaction in microRNA-mediated deadenylation. *Nature structural & molecular biology*, 17(2), pp.238–240.
- Juvvuna, P.K. et al., 2012. Argonaute identity defines the length of mature mammalian

BIBLIOGRAPHIE

- microRNAs. *Nucleic acids research*.
- Kanellopoulou, C. et al., 2005. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes & development*, 19(4), pp.489–501.
- Kawamata, T. & Tomari, Y., 2010. Making RISC. *Trends in biochemical sciences*, 35(7), pp.368–376.
- Kawamata, T., Seitz, H. & Tomari, Y., 2009. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nature structural & molecular biology*, 16(9), pp.953–960.
- Kedde, M. et al., 2007. RNA-Binding Protein Dnd1 Inhibits MicroRNA Access to Target mRNA. *Cell*, 131(7), pp.1273–1286.
- Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S.D., 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2), pp.209–216.
- Kim, D.H. et al., 2006. Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nature structural & molecular biology*, 13(9), pp.793–797.
- Kinch, L.N. & Grishin, N.V., 2009. The human Ago2 MC region does not contain an eIF4E-like mRNA cap binding motif. *Biology direct*, 4, p.2.
- Kiriakidou, M. et al., 2007. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*, 129(6), pp.1141–1151.
- Kozlov, G. et al., 2010. Structural basis of binding of P-body-associated proteins GW182 and ataxin-2 by the Ml1e domain of poly(A)-binding protein. *The Journal of biological chemistry*, 285(18), pp.13599–13606.
- Krützfeldt, J. et al., 2005. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, 438(7068), pp.685–689.
- Kuramochi-Miyagawa, S. et al., 2008. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes & development*, 22(7), pp.908–917.
- Kwak, P.B. & Tomari, Y., 2012. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature Publishing Group*, 19(2), pp.145–151.
- Lagos-Quintana, M. et al., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, NY)*, 294(5543), pp.853–858.
- Lagos-Quintana, M. et al., 2003. New microRNAs from mouse and human. *RNA (New York, NY)*, 9(2), pp.175–179.
- Lai, E.C. et al., 2003. Computational identification of Drosophila microRNA genes. *Genome biology*, 4(7), p.R42.
- Landthaler, M. et al., 2008. Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *RNA (New York, NY)*,

BIBLIOGRAPHIE

- 14(12), pp.2580–2596.
- Landthaler, M., Yalcin, A. & Tuschl, T., 2004. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Current biology : CB*, 14(23), pp.2162–2167.
- Lau, N.C. et al., 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, NY)*, 294(5543), pp.858–862.
- Lazaretti, D., Tournier, I. & Izaurralde, E., 2009. The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *RNA (New York, NY)*, 15(6), pp.1059–1066.
- Lee, R.C. & Ambros, V., 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, NY)*, 294(5543), pp.862–864.
- Lee, Y. et al., 2004a. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), pp.4051–4060.
- Lee, Y. et al., 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*, 21(17), pp.4663–4670.
- Lee, Y. et al., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), pp.415–419.
- Lee, Y.S. et al., 2004b. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117(1), pp.69–81.
- Lee, Y.S. et al., 2009. Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nature Cell Biology*, 11(9), pp.1150–1156.
- Leung, A.K.L., Calabrese, J.M. & Sharp, P.A., 2006. Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48), pp.18125–18130.
- Leuschner, P.J.F. et al., 2006. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep*, 7(3), pp.314–320.
- Lewis, B.P. et al., 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115(7), pp.787–798.
- Lian, S.L. et al., 2009. The C-terminal half of human Ago2 binds to multiple GW-rich regions of GW182 and requires GW182 to mediate silencing. *RNA (New York, NY)*, 15(5), pp.804–813.
- Lim, L.P. et al., 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027), pp.769–773.
- Lim, L.P. et al., 2003. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development*, 17(8), pp.991–1008.

BIBLIOGRAPHIE

- Lingel, A. et al., 2004. Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nature structural & molecular biology*, 11(6), pp.576–577.
- Lingel, A. et al., 2003. Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, 426(6965), pp.465–469.
- Liu, J. et al., 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science (New York, NY)*, 305(5689), pp.1437–1441.
- Liu, J., Rivas, F.V., et al., 2005a. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nature Cell Biology*, 7(12), pp.1261–1266.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., et al., 2005b. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biology*, 7(7), pp.719–723.
- Liu, Q. et al., 2003. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. *Science (New York, NY)*, 301(5641), pp.1921–1925.
- Liu, X., Fortin, K. & Mourelatos, Z., 2008. MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 18(1), pp.113–121.
- Liu, Y. et al., 2009. C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation. *Science (New York, NY)*, 325(5941), pp.750–753.
- Lund, E. et al., 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, NY)*, 303(5654), pp.95–98.
- Ma, J.-B. et al., 2005. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*, 434(7033), pp.666–670.
- Ma, J.-B., Ye, K. & Patel, D.J., 2004. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, 429(6989), pp.318–322.
- MacRae, I.J. et al., 2008. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2), pp.512–517.
- Maiti, M., Lee, H.-C. & Liu, Y., 2007. QIP, a putative exonuclease, interacts with the Neurospora Argonaute protein and facilitates conversion of duplex siRNA into single strands. *Genes & development*, 21(5), pp.590–600.
- Maniataki, E. & Mourelatos, Z., 2005. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes & development*, 19(24), pp.2979–2990.
- Maroney, P.A. et al., 2006. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature structural & molecular biology*, 13(12), pp.1102–1107.
- Martinez, J. & Tuschl, T., 2004. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes & development*, 18(9), pp.975–980.
- Martinez, J. et al., 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in

BIBLIOGRAPHIE

- RNAi. *Cell*, 110(5), pp.563–574.
- Mathonnet, G. et al., 2007. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science (New York, NY)*, 317(5845), pp.1764–1767.
- Matranga, C. et al., 2005. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 123(4), pp.607–620.
- Mayr, C., Hemann, M.T. & Bartel, D.P., 2007. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science (New York, NY)*, 315(5818), pp.1576–1579.
- Meister, G. & Tuschl, T., 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006), pp.343–349.
- Meister, G. et al., 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular cell*, 15(2), pp.185–197.
- Meister, G. et al., 2005. Identification of novel argonaute-associated proteins. *Current biology : CB*, 15(23), pp.2149–2155.
- Mescalcin, A. et al., 2010. Antisense tools for functional studies of human Argonaute proteins. *RNA (New York, NY)*, 16(12), pp.2529–2536.
- Meyer, R.A. & Brunsting, A., 1975. Light scattering from nucleated biological cells. *Biophysical journal*, 15(3), pp.191–203.
- Mi, S. et al., 2008. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, 133(1), pp.116–127.
- Miska, E.A. et al., 2007. Most Caenorhabditis elegans microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS genetics*, 3(12), p.e215.
- Miyoshi, K. et al., 2005. Slicer function of Drosophila Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes & development*, 19(23), pp.2837–2848.
- Monteys, A.M. et al., 2010. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA (New York, NY)*, 16(3), pp.495–505.
- Montgomery, T.A. et al., 2008. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell*, 133(1), pp.128–141.
- Morris, K.V. et al., 2004. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science (New York, NY)*, 305(5688), pp.1289–1292.
- Mu, P. et al., 2009. Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes & development*, 23(24), pp.2806–2811.
- Mukherji, S. et al., 2011. MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression. *Nature Publishing Group*, 43(9), pp.854–859.

BIBLIOGRAPHIE

- Mullokandov, G. et al., 2012. High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries. *Nature methods*, 9(8), pp.840–846.
- Murchison, E.P. et al., 2005. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34), pp.12135–12140.
- Nottrott, S., Simard, M.J. & Richter, J.D., 2006. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature structural & molecular biology*, 13(12), pp.1108–1114.
- Nykänen, A., Haley, B. & Zamore, P.D., 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 107(3), pp.309–321.
- Okamura, K. et al., 2004. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & development*, 18(14), pp.1655–1666.
- Okamura, K. et al., 2007. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130(1), pp.89–100.
- Okamura, K., Balla, S., et al., 2008a. Two distinct mechanisms generate endogenous siRNAs from bidirectional transcription in *Drosophila melanogaster*. *Nature Publishing Group*, 15(6), pp.581–590.
- Okamura, K., Chung, W.-J., et al., 2008b. The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature*, 453(7196), pp.803–806.
- Olsen, P.H. & Ambros, V., 1999. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental biology*, 216(2), pp.671–680.
- Overhoff, M. et al., 2005. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *Journal of molecular biology*, 348(4), pp.871–881.
- Parker, J.S. & Barford, D., 2006. Argonaute: A scaffold for the function of short regulatory RNAs. *Trends in biochemical sciences*, 31(11), pp.622–630.
- Parker, J.S., Roe, S.M. & Barford, D., 2004. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *The EMBO journal*, 23(24), pp.4727–4737.
- Parker, J.S., Roe, S.M. & Barford, D., 2005. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature*, 434(7033), pp.663–666.
- Parker, R. & Song, H., 2004. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature structural & molecular biology*, 11(2), pp.121–127.
- Peters, L. & Meister, G., 2007. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Molecular cell*, 26(5), pp.611–623.
- Petersen, C.P. et al., 2006. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian

BIBLIOGRAPHIE

- cells. *Molecular cell*, 21(4), pp.533–542.
- Pham, J.W. et al., 2004. A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell*, 117(1), pp.83–94.
- Piao, X. et al., 2010. CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells. *Molecular and cellular biology*, 30(6), pp.1486–1494.
- Pillai, R.S. et al., 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science (New York, NY)*, 309(5740), pp.1573–1576.
- Pillai, R.S., Artus, C.G. & Filipowicz, W., 2004. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA (New York, NY)*, 10(10), pp.1518–1525.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N. & Filipowicz, W., 2007. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in cell biology*, 17(3), pp.118–126.
- Poliseno, L. et al., 2010. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*, 465(7301), pp.1033–1038.
- Rana, T.M., 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(1), pp.23–36.
- Rand, T.A. et al., 2005. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123(4), pp.621–629.
- Rehwinkel, J. et al., 2005. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA (New York, NY)*, 11(11), pp.1640–1647.
- Rehwinkel, J. et al., 2006. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by Drosha and Argonaute proteins in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and cellular biology*, 26(8), pp.2965–2975.
- Rivas, F.V. et al., 2005. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nature structural & molecular biology*, 12(4), pp.340–349.
- Robb, G.B. et al., 2005. Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nature structural & molecular biology*, 12(2), pp.133–137.
- Rodriguez, A. et al., 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*, 14(10A), pp.1902–1910.
- Ruby, J.G., Jan, C.H. & Bartel, D.P., 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149), pp.83–86.
- Saini, H.K., Griffiths-Jones, S. & Enright, A.J., 2007. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(45), pp.17719–17724.

BIBLIOGRAPHIE

- Salmena, L. et al., 2011. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell*, 146(3), pp.353–358.
- Sasaki, T. et al., 2003. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics*, 82(3), pp.323–330.
- Schirle, N.T. & MacRae, I.J., 2012. The Crystal Structure of Human Argonaute2. *Science (New York, NY)*.
- Schmitter, D. et al., 2006. Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells. *Nucleic acids research*, 34(17), pp.4801–4815.
- Schubert, S. et al., 2005. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *Journal of molecular biology*, 348(4), pp.883–893.
- Schwarz, D.S. et al., 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115(2), pp.199–208.
- Schwarz, D.S., Tomari, Y. & Zamore, P.D., 2004. The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. *Current biology : CB*, 14(9), pp.787–791.
- Seggerson, K., Tang, L. & Moss, E.G., 2002. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Developmental biology*, 243(2), pp.215–225.
- Seitz, H., 2009. Redefining microRNA targets. *Current biology : CB*, 19(10), pp.870–873.
- Seitz, H., Tushir, J.S. & Zamore, P.D., 2011. A 5'-uridine amplifies miRNA/miRNA* asymmetry in *Drosophila* by promoting RNA-induced silencing complex formation. *Silence*, 2, p.4.
- Selbach, M. et al., 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(7209), pp.58–63.
- Sen, G.L. & Blau, H.M., 2005. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature Cell Biology*, 7(6), pp.633–636.
- Sibley, C.R. et al., 2012. The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin. *Nucleic acids research*, 40(1), pp.438–448.
- Siomi, M.C. et al., 2011. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(4), pp.246–258.
- Song, J.-J. & Joshua-Tor, L., 2006. Argonaute and RNA--getting into the groove. *Current opinion in structural biology*, 16(1), pp.5–11.
- Song, J.-J. et al., 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science (New York, NY)*, 305(5689), pp.1434–1437.
- Song, J.-J. et al., 2003. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nature structural biology*, 10(12),

BIBLIOGRAPHIE

- pp.1026–1032.
- Song, R. et al., 2011. Male germ cells express abundant endogenous siRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(32), pp.13159–13164.
- Su, H. et al., 2009. Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. *Genes & development*, 23(3), pp.304–317.
- Su, H. et al., 2011. Mammalian hyperplastic discs homolog EDD regulates miRNA-mediated gene silencing. *Molecular cell*, 43(1), pp.97–109.
- Takeda, A. et al., 2008. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant & cell physiology*, 49(4), pp.493–500.
- Takimoto, K., Wakiyama, M. & Yokoyama, S., 2009. Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *RNA (New York, NY)*.
- Tam, O.H. et al., 2008. Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature*, 453(7194), pp.534–538.
- Tay, Y. et al., 2011. Coding-Independent Regulation of the Tumor Suppressor PTEN by Competing Endogenous mRNAs. *Cell*, 147(2), pp.344–357.
- Thomson, J.M. et al., 2006. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes & development*, 20(16), pp.2202–2207.
- Tian, Y. et al., 2011. Multimeric assembly and biochemical characterization of the Trax-translin endonuclease complex. *Nature Publishing Group*, 18(6), pp.658–664.
- Till, S. et al., 2007. A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nature structural & molecular biology*, 14(10), pp.897–903.
- Tolia, N.H. & Joshua-Tor, L., 2007. Slicer and the argonautes. *Nature chemical biology*, 3(1), pp.36–43.
- Tomari, Y., Du, T. & Zamore, P.D., 2007. Sorting of Drosophila small silencing RNAs. *Cell*, 130(2), pp.299–308.
- Tomari, Y., Du, T., et al., 2004a. RISC assembly defects in the Drosophila RNAi mutant armitage. *Cell*, 116(6), pp.831–841.
- Tomari, Y., Matranga, C., et al., 2004b. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science (New York, NY)*, 306(5700), pp.1377–1380.
- Wakiyama, M. et al., 2007. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes & development*, 21(15), pp.1857–1862.

BIBLIOGRAPHIE

- Wang, B. et al., 2009a. Distinct passenger strand and mRNA cleavage activities of human Argonaute proteins. *Nature structural & molecular biology*, 16(12), pp.1259–1266.
- Wang, Y. et al., 2009b. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature*, 461(7265), pp.754–761.
- Wang, Y., Juranek, S., et al., 2008a. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature*, 456(7224), pp.921–926.
- Wang, Y., Sheng, G., et al., 2008b. Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature*, 456(7219), pp.209–213.
- Watanabe, T. et al., 2008. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*, 453(7194), pp.539–543.
- Wei, J.-X. et al., 2009. Both strands of siRNA have potential to guide posttranscriptional gene silencing in mammalian cells. *PloS one*, 4(4), p.e5382.
- Weitzer, S. & Martinez, J., 2007. The human RNA kinase hClp1 is active on 3' transfer RNA exons and short interfering RNAs. *Nature*, 447(7141), pp.222–226.
- Wells, S.E. et al., 1998. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Molecular cell*, 2(1), pp.135–140.
- Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), pp.855–862.
- Wu, L., Fan, J. & Belasco, J.G., 2006. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), pp.4034–4039.
- Yan, K.S. et al., 2003. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*, 426(6965), pp.468–474.
- Yang, J.-S. & Lai, E.C., 2011. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular cell*, 43(6), pp.892–903.
- Yang, J.-S. et al., 2010. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), pp.15163–15168.
- Yang, Z. et al., 2004. GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *Journal of cell science*, 117(Pt 23), pp.5567–5578.
- Yao, B. et al., 2011. Divergent GW182 functional domains in the regulation of translational silencing. *Nucleic acids research*, 39(7), pp.2534–2547.
- Ye, X. et al., 2011. Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. *Nature Publishing Group*, 18(6), pp.650–657.
- Yekta, S., Shih, I.-H. & Bartel, D.P., 2004. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8

BIBLIOGRAPHIE

- mRNA. *Science (New York, NY)*, 304(5670), pp.594–596.
- Yi, R. et al., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*, 17(24), pp.3011–3016.
- Yoda, M. et al., 2010. ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nature structural & molecular biology*, 17(1), pp.17–23.
- Yuan, Y.-R. et al., 2005. Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Molecular cell*, 19(3), pp.405–419.
- Zdanowicz, A. et al., 2009. *Drosophila* miR2 primarily targets the m7GpppN cap structure for translational repression. *Molecular cell*, 35(6), pp.881–888.
- Zekri, L. et al., 2009. The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Molecular and cellular biology*, 29(23), pp.6220–6231.
- Zhang, H. et al., 2002. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *The EMBO journal*, 21(21), pp.5875–5885.
- Zhang, H. et al., 2004. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, 118(1), pp.57–68.
- Zipprich, J.T. et al., 2009. Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA (New York, NY)*, 15(5), pp.781–793.